

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
28 août 2003 (28.08.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 03/070755 A2**

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> : C07K 7/64

(74) Mandataires : BREESE, Pierre etc.; Breesé-Majerowicz,  
3, Avenue de l'Opéra, F-75001 Paris (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR03/00591

(22) Date de dépôt international :

24 février 2003 (24.02.2003)

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

02/02299

22 février 2002 (22.02.2002) FR

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) :  
SYNT:EM [FR/FR]; Allée Charles Babbage, Parc Sci-  
entifique Georges Besse, F-30900 Nîmes (FR). MAAS  
BIOLAB, LLC [US/US]; 1934 Quail Run Loop NE,  
Albuquerque, NM 87122 (US).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,  
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,  
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,  
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,  
MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,  
SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,  
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,  
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet  
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet  
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,  
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR),  
brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,  
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) :  
MOUCHET, Patrick [FR/FR]; 6 rue des Saladelles,  
F-30300 Fourques (FR). REES, Anthony, R. [GB/FR];  
Mas de la Font, Castelnau Valence, F-30190 Saint-Chartes  
(FR). ELMER, Eskil [SE/SE]; Parternas Grande 57,  
S-226 47 Lund (SE). KEEP, Marcus, Floyd [US/US];  
1934 Quail Run Loop NE, Albuquerque, NM 87122 (US).

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée  
dès réception de ce rapport

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.

(54) Title: COMPOUNDS, COMPOSITIONS AND METHOD FOR TRANSPORTING CYCLOSPORIN MOLECULES  
THROUGH THE BLOOD BRAIN BARRIER

(54) Titre : COMPOSES, COMPOSITIONS ET MÉTHODE POUR LE TRANSPORT DES MOLÉCULES DE CYCLOSPORINE  
A TRAVERS LA BARRIÈRE HÉMATO-ENCÉPHALIQUE

(57) Abstract: The invention concerns a compound comprising at least a cyclosporin molecule and at least a peptide vector capable  
of transporting said molecule through the blood brain barrier. The invention also concerns the use of said compound for preparing  
pharmaceutical compositions in particular for treating or preventing disease of the central nervous system.

(57) Abrégé : La présente invention concerne un composé qui comprend au moins une molécule de cyclosporine et au moins un  
vecteur peptidique capable de transporter ladite molécule à travers la barrière hémato-encéphalique. L'invention concerne aussi l'uti-  
lisation dudit composé pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinées notamment au traitement ou à la prévention  
de maladie du système nerveux central.

WO 03/070755 A2

COMPOSES, COMPOSITIONS ET METHODE POUR LE  
TRANSPORT DES MOLECULES DE CYCLOSPORINE A TRAVERS LA  
BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE

5                    DOMAINE DE L'INVENTION

La présente invention se rapporte à l'utilisation de peptides vecteurs pour le transport des molécules de Cyclosporine à travers la barrière hémato-encéphalique (BHE) ainsi qu'à l'utilisation desdits  
10 composés pour la préparation de médicaments utiles pour les maladies cérébrales comprenant les traumatismes cérébraux, les dommages de la moelle épinière, l'accident vasculaire cérébral, et les maladies neurodégénératives incluant la maladie d'Alzheimer, de Parkinson, de Huntington et de  
15 Charcot (sclérose amyotrophique latérale) aussi bien que les scléroses multiples.

LA CYCLOSPORINE.

La cyclosporine A est un médicament  
20 immunosuppresseur. Le traitement médical décrit ci-dessous a déjà été décrit, dans le Brevet Américain No. 4,117,118 et de nombreux autres, qui relatent sa production, sa formulation et ses propriétés immunosuppressives.

La cyclosporine A est produite par le  
25 champignon *Tolypocladium Inflatum* Gams. C'est un poly-aminoacide cyclique, constitué de 11 acides aminés. L'un de ces acides aminés, un  $\beta$ -hydroxyaminoacide appelé butényl-méthyl-thréonine (MeBmt) existe uniquement dans la cyclosporine A. Le poids moléculaire est de 1202,6 et la  
30 composition chimique est  $C_{62}H_{111}N_{11}O_{12}$ .

La molécule est hautement lipophile, et donc peu soluble dans l'eau. Le médicament est transporté dans le sang pour 58% à l'intérieur des hématies, pour approximativement 10-20% dans les leucocytes, et 33% se lie  
35 aux protéines plasmatiques. Dans le plasma, la cyclosporine

A est liée aux lipoprotéines de haut poids moléculaire (HDL), de faible poids moléculaire (LDL), très faible poids moléculaire (VHDL) et une petite fraction à l'albumine. Une très petite fraction est libre dans le plasma.

5           La molécule est métabolisée, principalement dans le foie par le cytochrome P450. Il existe au moins 40 métabolites connus de la cyclosporine A, avec diverses modifications chimiques, comme des hydroxylations, des déméthylations, des oxydations et des formations d'époxide.

10 Il existe de nombreux variants de la cyclosporine A, différant par exemple par un acide aminé, qui ont des propriétés pharmacologiques similaires. Normalement, la cyclosporine A ainsi que la plupart de ses métabolites ne passent pas la barrière hémato-encéphalique (Begley et al.,

15 1990 ; Lensmeyer et al., 1991). Quand le transporteur glycoprotéine-P est inactif ou que la barrière hémato-encéphalique est rompue, la cyclosporine peut passer à travers et entrer en contact avec les neurones. Plusieurs analogues de la cyclosporine peuvent facilement traverser

20 la barrière hémato-encéphalique. Plusieurs analogues de la cyclosporine ne sont pas immunosuppresseurs. Il y a un sous-ensemble d'analogues de la cyclosporine qui peuvent à la fois passer facilement la barrière hémato-encéphalique et qui ne sont pas immunosuppresseurs.

25           Le transporteur glycoprotéine-P est apparenté au MDR ou « résistance multi-drogues ». On trouve la protéine MDR dans diverses cellules tumorales et elle est responsable du transport actif vers l'extérieur d'autres médicaments chimiothérapeutiques efficaces. La présence du

30 MDR confère aux cellules tumorales la résistance à ces médicaments chimiothérapeutiques et empêche l'effet anti-tumoral recherché. La cyclosporine est un inhibiteur du MDR, et permet aux molécules thérapeutiques de pénétrer dans les cellules tumorales, provoquant un meilleur effet

35 anti-tumoral.

La famille des cyclosporines comprend les cyclosporines A à Z, incluant la cyclosporine C, la cyclosporine D, la cyclosporine G et la cyclosporine O. Certains des métabolites connus de la cyclosporine A comprennent : (selon la nomenclature « Hawk's Cay ») AM1, AM9, AM1c, AM4N, AM19, AM1c9, AM1c4N9, AM1A, AM1A4N, AM1Ac, AM1AL, AM1ld, AM69, AM4N9, AM14N, AM14N9, AM4N69, AM99N, Dihydro-CsA, Dihydro-CsC, Dihydro-CsD, Dihydro-CsG, M17, AM1c-GLC, conjugué sulphate de cyclosporine, BH11a, BH15a, B, G, E, O (et venant se chevaucher avec la nomenclature de Hawk's ci-dessus, selon la nomenclature de Maurer) M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, M10, M11, M12, M13, M14, M15, M16, M17, M18, M19, M20, M21, M22, M23, M24, M25, M26, MUNDFl and MeBMT. Certains métabolites de la cyclosporine G comprennent GM1, GM9, GM4N, GM1c, GM1c9, et GM19. Les cyclosporines modifiées incluent les analogues d'acides aminés modifiés en C-9, les analogues d'acides aminés modifiés en position 8, les analogues modifiés en position 6 contenant des résidus MeAla ou MeAbu, et SDZ-209-313, SDZ-205-549, SDZ-033-243, et SDZ-PCS-833. D'autres cyclosporines modifiées comprennent des variants partiellement et complètement deutérés ou tritiés, de même que d'autres isotopes substitués comprennent le carbone, l'azote et l'oxygène. On inclut des cyclosporines rendues solubles par l'addition de phosphate ou d'autres groupes hydrophiles.

On désignera ci-après par les termes cyclosporine ou cyclosporines cette famille entière de cyclosporines comme décrite ci-dessus, incluant la cyclosporine A, tous les dérivés de cyclosporine, variants, variants en acides aminés, isotopes, métabolites, comprenant des dérivés mono-, di- et trihydroxylés, N-déméthylés, aldéhydes, carboxyles, conjugués, sulphates, glucuronides, phosphates, cyclisations intramoléculaire et les variants ne comportant pas de structure cyclique tout

comme les peptides plus courts et les acides aminés et leurs dérivés et sels avec ou sans propriétés immunosuppressives capables ou non de traverser la barrière hémato-encéphalique.

5 Les cyclosporines sont hautement lipophiles et généralement peu solubles dans l'eau. Elles nécessitent en général un émulsifiant, comme le cremophore ou le Labrafil pour rester en phase aqueuse. Des réactions anaphylactiques et neurotoxiques ont été décrites après l'emploi de ces  
10 émulsifiants (notamment le cremophore, une huile de ricin éthylée). Le besoin d'une formulation améliorée qui aurait une meilleure solubilité dans l'eau et traverserait mieux la barrière hémato-encéphalique et ne serait ni anaphylactique ni neurotoxique est important.

15

LES MECANISMES D'ACTION DE LA CYCLOSPORINE EN  
TANT QUE NEUROPROTECTEUR.

La cyclosporine s'est avérée être la molécule neuroprotectrice la plus efficace jamais trouvée pour un  
20 grand nombre de maladies neurologiques, comme l'indique le brevet américain 5,972.924 et de nombreux articles scientifiques (Borlongan et al., 2000 ; Friberg et al., 1998; Keep et al., 2001; Leventhal et al., 2000; Li et al., 1997; Okonkwo et al., 1999; Okonkwo and Povlishock, 1999;  
25 Petersen et al., 2000; Scheff and Sullivan, 1999; Sullivan et al., 2000a; Sullivan et al., 2000b; Sullivan et al., 1999; Uchino et al., 1998; Uchino et al., 1995; Yoshimoto and Siesjö, 1999). La cyclosporine est aussi utile dans le traitement de tumeurs cérébrales en tant que  
30 radioprotecteur neuronal sélectif autorisant des taux croissants de traitement et amenuisant les troubles psychologiques induits par les radiations, comme indiqué dans la demande de brevet PCT/US98/20040. On a suggéré que la cyclosporine limitait les dégâts cérébraux par de  
35 multiples mécanismes importants. La cyclosporine se lie et

inhibe la cyclophiline, une peptidyl-prolyl isomérase qui est impliquée dans le repliement normal et anormal des protéines, et qui apparaît être impliquée dans la neuroprotection et la neurodégénération. Le complexe cyclosporine-cyclophiline inhibe à la fois l'activité phosphatase (Liu et al., 1991) de la calcineurine (une phosphatase calcium-dépendante des radicaux sérine/thréonine des protéines bien connue), et prévient l'activation de cascades enzymatiques calcium-dépendantes potentiellement neurotoxiques. L'inhibition de la calcineurine bloque aussi l'oxyde nitrique synthase et la production d'oxyde nitrique, réduisant les radicaux libres intracellulaires destructeurs. La cyclosporine a aussi pour effet de stabiliser les mitochondries. En outre, la cyclosporine empêche la perte du gradient de protons mitochondrial, préservant ainsi la production d'énergie vitale (ATP). De plus, la cyclosporine empêche l'apparition du phénomène de transition de perméabilité mitochondriale prévenant le relargage de protéines telles que l'Apoptosis Inducing Factor (AIF), le cytochrome c et la procaspase 9 qui, lorsqu'elle est présente dans le cytosol, induit la cascade des caspases et des autres voies léthales menant à la mort cellulaire neuronale (Bernardi, 1996; Bernardi et al., 1998). Enfin, la cyclosporine est neuroprotectrice grâce à une influence sur la transcription des gènes des cellules nerveuses, par exemple en affectant la transcription du gène « brain-derived neurotrophic factor » (BDNF) (Miyata et al., 2001). Cette combinaison d'effets neuronaux confère à la cyclosporine sa puissante action neuroprotectrice dans un grand nombre de maladies neurologiques pouvant inclure de manière non exhaustive les dégâts cérébraux issus d'un traumatisme, d'une commotion, d'une infection, de radiations et de maladies neurodégénératives, comme décrit ci-dessous.

CYCLOSPORINE ET MALADIES NEURODEGENERATIVES.

La cyclosporine est la molécule neuroprotectrice la plus efficace connue, même si elle est administrée à posteriori du traumatisme cérébral. La  
5 cyclosporine, via les voies décrites ci-dessus, prévient la mort neuronale induite par les dommages issus d'un traumatisme, d'une ischémie ou d'un déséquilibre métabolique, des toxines ou une neurodégénérescence. Les conditions dans lesquelles la cyclosporine est efficace  
10 sont inventoriées ci-dessous.

- Les traumatismes cérébraux et médullaires, comprenant les interventions neurochirurgicales.

Les traumatismes cérébraux comprennent les dommages causés par des phénomènes d'accélération ou de  
15 décélération, de section d'un axone, et les dommages à la fois visibles ou non visibles causés au parenchyme cérébral et aux vaisseaux. Le dégât initial est suivi par une cascade d'événements qui étendent les dommages cérébraux jours après jours. Les traumatismes cérébraux peuvent avoir  
20 pour conséquence une commotion, une amnésie, une léthargie, des changements de la personnalité, une perte des fonctions sensorimotrice, cognitive, mnésique et des déficits de concentration, le coma ou la mort.

Un traumatisme cérébral ou médullaire peut  
25 résulter d'un traumatisme par contusion ou par perforation comprenant les accidents de la route, la pratique de sports, les chutes, un coup, un projectile ou une balle, et de différentes sources d'énergie incluant l'électricité, la chaleur et l'onde de choc. Le traumatisme dû à la naissance  
30 par forceps peut causer des contusions cérébrales et l'élongation du plexus brachial.

Les procédés neurochirurgicaux ou la chirurgie cérébrale endommagent le cerveau sain par la pression, la section, le traumatisme direct, l'axotomie et l'ischémie.  
35 Certains procédés neurochirurgicaux incluent une

craniotomie et tréphine, ainsi que les cavités percées à travers le crâne dans le but d'effectuer une lobectomie, une résection du tissu cérébral, une biopsie, une résection tumorale, le clippage d'un anévrisme, le retrait  
5 d'une malformation vasculaire, des reconstructions et des traumatismes. Les implants neurochirurgicaux cérébraux incluent des shunts ventriculaires ou cérébrospinaux et des appareils d'accès à des pompes ou des réservoirs, des dispositifs de pression subarachnoïde ou  
10 intraparenchymateuse intracérébrale, des dispositifs de dialyse cérébrale de température ou d'oxygène, des électrodes profondes, des grilles corticales, des électrodes cyberneurales, des puces électroniques ou des interfaces ou des implants d'ordinateur, des moniteurs de  
15 scalp fœtal, des stimulateurs profonds du cerveau et des transplantations intracérébrales de neurones et de neurones artificiels ou de facteurs de production cellulaire ou encore de vecteurs viraux. Les implants et les prothèses comprennent la rétine, le nerf optique, le tronc cérébral,  
20 le cortex thalamique ou occipital, des implants cochléaires, vestibulaires, du nerf auditif, du tronc cérébral, et des implants du lobe thalamique ou temporal, et des implants ou des grilles corticales et des appareils prosthétiques, des systèmes spinaux et autres systèmes  
25 sensorimoteurs.

La neurochirurgie et les chirurgies orthopédique spinale peuvent endommager la moelle épinière par compression, pression, élongation, lacération, contusion, section, axotomie, hémorragie, et ischémie. Les  
30 procédés incluent la discectomie, la fusion, la laminectomie, l'instrumentation et la reconstruction cervicale, thoracique ou lombaire, pour les hernies discales, les sténoses, les tumeurs, les infections, les malformations vasculaires, les fractures et les  
35 dislocations osseuses, ainsi que les malformations, la



croissance et la scoliose des os et des tissus mous. Les implants spinaux incluent les cathéters, les pompes, les stimulateurs de la moelle épinière et les appareils cyberneuraux, tout comme les greffes biologiques incluant  
5 les cellules fœtales, les cellules souches et les cellules manipulées ou les vecteurs viraux.

- Accident vasculaire cérébral.

L'accident vasculaire cérébral inclut l'accident vasculaire cérébral ischémique focal, l'accident  
10 vasculaire cérébral ischémique global et l'accident vasculaire cérébral hémorragique. L'embolie cérébrale bloque la totalité ou la quasi-totalité du flux sanguin d'une région spécifique du cerveau. La perte d'oxygène et de nutriments cause rapidement aux neurones la perte de  
15 leur hémostasie, et ces derniers meurent. Les cellules se trouvant dans la zone de pénombre autour de la zone d'embolie, et les cellules re-perfusées dans la pénombre ischémique et le noyau, peuvent être sauvées par une molécule neuroprotectrice.

20 L'accident vasculaire cérébral ischémique global advient durant une période de réduction de l'apport de sang ou d'oxygène à la totalité du cerveau. Certaines cellules sont plus propices à l'ischémie globale, plus particulièrement les neurones de l'hippocampe associés à la  
25 mémoire et certains neurones corticaux.

L'accident vasculaire cérébral hémorragique est une infiltration de sang dans le cerveau, ou des espaces de fluide cérébro-spinal provenant des artères, des veines, des malformations de type anévrisme ou vasculaire. Le  
30 dommage est causé par une pression directe sur le cerveau, causant une lésion cérébrale locale et un traumatisme, une ischémie, le spasme d'un vaisseau et la fabrication de produits toxiques de décomposition de sang.

L'accident vasculaire cérébral embolique peut  
35 être spontané, peut être d'origine cardiaque, septique,

athéromateux, tumoral, avoir comme source les lipides, la moelle et l'air. On sait que l'embolie provient de procédés variables incluant la déviation d'artère coronaire, l'endarterectomie carotidienne, l'angiographie, l'angioplastie coronarienne, les procédés coronariens, carotidiens et vertébraux incluant le stenting.

L'accident vasculaire cérébral global est une ischémie de la totalité du cerveau et peut être issu d'un arrêt cardiaque, d'une noyade, d'une asphyxie, d'un choc, d'une hypotension, du spasme d'un vaisseau, d'une arythmie, d'une dissociation électromécanique cardiaque, d'une crise d'asthme, d'une hypotension causée par un acte de chirurgie, d'une perte de sang, d'une anaphylaxie et d'une asphyxie néonatale.

Les accidents vasculaires cérébraux hémorragiques incluent une hémorragie hypertensive, une angiopathie congophile, une hémorragie intracérébroventriculaire de prématurité, une rupture d'anévrisme et le spasme de vaisseau et les malformations artérioveineuses et autres malformations vasculaires. Ceci inclut aussi la thrombose du sinus veineux ou une thrombose de la veine de drainage cortical causant un infarctus veineux, un choc thermique et un traumatisme dû à la pression ou une maladie due à la décompression et à l'augmentation de la pression intracrânienne.

- Les désordres métaboliques incluant les encéphalopathies hépatique et urémique.

Les désordres métaboliques peuvent troubler la fonction et la structure cérébrales de manière temporaire ou permanente. Ceux-ci incluent les états épileptiques, le coma diabétique (hypoglycémique ou hyperosmolaire), l'éclampsie, la pré-éclampsie, l'encéphalopathie hépatique, l'encéphalopathie urémique et le kernicterus ou l'ictère du nouveau-né.

- Toxines.

Les neurotoxines et les toxines endommagent ou désorganisent soit des populations de neurones spécifiques, ou le cerveau entier. Celles-ci comprennent les aminoglycosides, les hydrocarbures chlorés, les organophosphates, les insecticides, les herbicides, le paraquat, l'Agent Orange, les gaz innervant, le MPTP, la roténone, le cyanide, le monoxyde de carbone, le méthanol, l'éthanol, le mercure, l'arsenic et les agents chimiothérapeutiques incluant le méthotrexate, la mercaptopurine, le fluoroacil, les nitrosurées, l'hydroxyurée, le cisplatine, le carboplatine, la daunorubicine, la doxorubicine, l'ectoposide, la vincristine, la vinblastine, le taxol et ses dérivés, le cyclophosphamide, et les corticostéroïdes.

15                   - Virus, bactéries, prions et agents infectieux.

Les virus, les bactéries, les prions et les agents infectieux peuvent causer des dommages légers ou sévères au cerveau entier, ou à des parties spécifiques de ce dernier. Les exemples en sont *herpes encephalitis* qui affecte surtout les lobes temporaux et le virus de la poliomyélite qui affecte seulement les neurones moteurs spinaux. D'autres agents infectieux qui endommagent ou détruisent le cerveau sont *herpes zoster*, le virus rabique, le VIH (causant la démence du SIDA, la myélopathie du SIDA, la neuropathie du SIDA, la paraparésie tropicale), les maladies à prion comme la maladie de Creutzfeldt-Jacob typique et atypique, le Kuru, la scrapie et l'encéphalopathie bovine spongiforme. Pour exemples supplémentaires, nous avons les encéphalies virales et les méningites telles les méningites Equine, Japonaise, Dengue, Nile, la rougeole et la leucoencéphalopathie post-vaccinatoire progressive multifocale (virus JC) et la panencéphalite subaiguë sclérosante (virus de réactivation de la rougeole). D'autres agents infectieux affectant le

cerveau incluent la malaria, la maladie de Lyme et la neurosyphilis.

- Irradiation du cerveau.

Les radiations ionisantes produisent des radicaux libres et endommagent l'ADN de manière directe. Celles-ci tuent aussi les cellules, dont les neurones. Les cellules à division rapide, telles que les cellules tumorales, sont plus vulnérables, mais le taux de radiation qui peut être toléré par le cerveau ou la colonne vertébrale est limité par l'effet létal sur les neurones.

Les radiations médicales sont administrées via un accélérateur linéaire, des résidus de cobalt ou un implant d'isotopes radioactifs. Les radiations ou les faisceaux orientés de radiations agissant sur la totalité ou partie du cerveau détruisent les neurones causant la démence, et induisent la nécrose du cerveau sain. La protection des neurones sains permet d'infliger de plus fortes radiations aux tumeurs ou aux malformations vasculaires, ce qui a pour résultat un meilleur pourcentage de guérison, et réduit les complications dans le cerveau sain.

Des radiations d'origines variées, incluant les réacteurs nucléaires, le désassemblage d'appareils nucléaire, provenant de l'exposition directe à un rayonnement nucléaire, ou de résidus contaminés peuvent tuer les neurones et endommager le cerveau.

- Indications chroniques : les maladies neurodégénératives.

On pense que dans beaucoup de maladies neurodégénératives, la mort cellulaire neuronale est induite par des protéines toxiques anormales telles que l'amyloïde bêta, ou tau, la preseniline, l'alpha-synucleine, le huntingtine ou le SOD anormal.

Ces protéines anormales détruisent des populations de neurones sélectionnées en induisant un

stress métabolique et la production de radicaux libres. La mort cellulaire par neurodégénérescence advient via la voie mitochondriale finale commune. La cyclosporine empêche cette voie de mort mitochondriale finale commune et  
5 prévient la mort neuronale.

Les maladies neurodégénératives incluent la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la maladie de Huntington, le syndrome de Down, la maladie de Charcot, l'atrophie spinale musculaire, la paralysie bulbaire, la  
10 schizophrénie, le syndrome de Tourette, l'atrophie cérébrale corticale diffuse, la démence à corps de Lewy, la démence mésolimbocorticale, la dégénérescence thalamique, la maladie de Pick, l'atrophie multisystème, la dégénérescence cortico-striato-spinale, le syndrome de Shy-  
15 Drager, le syndrome de Richardson-Steele-Olzewski, le complexe Prakinson-SLA-Démence de Guam, le syndrome post-polio, l'atrophie olivocérébelleuse, l'ataxie de Friedreich, le syndrome paranéoplastique, l'encéphalopathie traumatique chronique (Démence  
20 pugilistique), la maladie de Wilson, la maladie de Menke, la gangliosidose Tay-Sachs et la maladie de Krabbe, la neuropathie périphérique, la neuropathie diabétique et le vieillissement. Les maladies neurologiques chroniques suspectées être de nature immune comprennent les scléroses  
25 multiples, le syndrome de Guillain-Barré, et le lupus érythémateux.

- Vision.

Les structures visuelles font partie du cerveau. Celles-ci comprennent la rétine, le nerf optique,  
30 le chiasma et le tractus, mais aussi les projections au tronc cérébral, le thalamus et le cortex occipital. La rétine et les neurones du nerf optique sont vulnérables aux traumatismes, à l'ischémie, à la pression, aux radiations, aux photons, aux troubles métaboliques et à la  
35 neurodégénérescence. Sous certaines conditions incluant le

glaucome, l'ischémie du nerf optique, la dégénérescence maculaire, les rétinites, les neurites optiques, le détachement rétinien, l'hémorragie rétinienne, la cécité provoquée par le rayonnement, la cécité due au méthanol, les traumatismes traumatiques et l'augmentation de pression intracrâniale.

#### LA BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE.

La barrière hémato-encéphalique est formée de cellules endothéliales qui, de différentes manières, forment un obstacle aux molécules qui tentent de les traverser. Tout d'abord, elles forment une barrière physique consistant en des jonctions serrées connectées les unes aux autres et prévenant tout passage via la voie paracellulaire, tout du moins pendant que l'activité d'endocytose sur place est faible. Tout cela contribue à limiter fortement le passage de molécules plasmatiques vers l'espace cérébral extracellulaire.

De plus, il existe des systèmes de transport ATP-dépendant à l'intérieur de l'endothélium capillaire cérébral qui exclut activement du cerveau les médicaments lipophiles tels que la cyclosporine. En particulier, la glycoprotéine-P, un système de transport, a été identifiée comme étant un exportateur actif de la cyclosporine hors de l'endothélium capillaire cérébral, et représente une part importante de blocage de la barrière hémato-encéphalique en ce qui concerne l'entrée de la cyclosporine dans le cerveau (Sakata et al., 1994; Tsuji et al.; 1993).

Ainsi, dans le cadre de ses travaux de recherche, la Demanderesse a démontré que des vecteurs peptidiques, par exemple des peptides linéaires dérivés de peptides naturels tels que la Protégrine et la Tachyplésine (Kokryakov et al., 1993; Tamura et al., 1993) transportent des molécules actives à travers la barrière hémato-encéphalique. La Protégrine et la Tachyplésine sont des

peptides naturels avec une structure de type épingle à cheveux formée par des ponts disulfure. Ces ponts jouent un rôle important dans l'activité cytolytique observée dans les cellules humaines. La réduction irréversible de ces ponts rend possible le fait d'obtenir des peptides linéaires, non cytotoxiques, capables de traverser rapidement les membranes des cellules de mammifères par des moyens qui ne nécessitent pas d'utiliser un récepteur membranaire (Temsamani et al., 2000; 2001; Rousselle et al., 2000; 2001 a & b; Mazel et al., 2001).

Le travail et ses résultats concernant ces peptides linéaires et leur utilisation en tant que peptide vecteur pour le passage de molécules actives à travers la barrière hémato-encéphalique ont été décrits dans la demande de brevet français N° 98/15074 déposée le 30 Novembre 1998 et la demande de brevet français N° 99/02938 déposée le 26 Novembre 1999.

#### DESCRIPTION DE L'INVENTION

La présente invention fournit des méthodes pour le transport de la cyclosporine à travers la barrière hémato-encéphalique (BHE) utilisant pour ce faire des vecteurs peptidiques. Ainsi, l'invention se rapporte tout d'abord à des composés qui comprennent au moins une molécule de cyclosporine et au moins un vecteur peptidique capable de transporter lesdites molécules à travers la barrière hémato-encéphalique.

Les molécules de cyclosporine, et plus particulièrement de cyclosporine A, sont décrites ci-dessus. Par l'intermédiaire d'un exemple non restrictif concernant le médicament, l'invention considère la cyclosporine et ses dérivés comme ayant un effet biologique similaire mais qui, tels quels, ne permettent pas de traverser la barrière hémato-encéphalique.

Suivant un mode de réalisation préféré, le vecteur peptidique capable de transporter la molécule de cyclosporine à travers la barrière hémato-encéphalique est un peptide linéaire dérivé des familles Protégrine et  
5 Tachyplésine.

Par peptide dérivé de la famille Protégrine, on entend tout peptide correspondant à la formule I suivante :



et par peptide dérivé de la famille  
10 Tachyplésine on entend tout peptide correspondant à la formule II suivante :



dans lesquelles :

- les groupes B, identiques ou différents,  
15 représentent un résidu d'un acide aminé dont la chaîne latérale porte un groupement basique, et

- les groupes X, identiques ou différents, représentent un résidu d'un acide aminé aliphatique ou aromatique,

20 ou lesdits peptides de formule (I) ou (II), dans leur forme retro, formés des acides aminés ayant une configuration D et/ou L,

ou un fragment formé d'une séquence d'au moins 5 et préférentiellement 7 acides aminés successifs des  
25 peptides ayant la formule (I) ou (II).

Dans une seconde forme de mise en œuvre de la présente invention, par peptide dérivé de la famille Protégrine, on entend tout peptide correspondant à la  
30 formule I suivante :



et par peptide dérivé de la famille Tachyplésine on entend tout peptide correspondant à la formule II suivante :





dans lesquelles :

- B est choisi parmi l'arginine, la lysine, l'acide diaminoacétique, l'acide diaminobutyrique, l'acide diaminopropionique, l'ornithine.

5                   - X est choisi parmi la glycine, l'alanine, la valine, la norleucine, l'isoleucine, la leucine, la cystéine, la <sup>Ac</sup>cystéine, la pénicillamine, la méthionine, la sérine, la thréonine, l'asparagine, la glutamine, la phénylalanine, l'histidine, le tryptophane, la tyrosine, la  
10 proline, l'acide amino-butyrique (Abu), l'acide amino-1-cyclohexane carboxylique, l'acide amino-isobutyrique (Aib), le carboxylic 2-aminotétraline, le 4-bromophénylalanine, la tert-Leucine, la 4-chlorophénylalanine, la beta-cyclohexylalanine, la 3,4-dichlorophénylalanine, la 4-  
15 fluorophénylalanine, l'homoleucine, la beta-homoleucine, l'homophénylalanine, la 4-méthylphénylalanine, la 1-naphtylalanine, la 2-naphtylalanine, la 4-nitrophenylalanine, la 3-nitrotyrosine, la norvaline, la phenylglycine, la 3-pyridylalanine, la [2-thienyl]alanine,

20                   ou lesdits peptides de formule (I) ou (II), dans leur forme retro, formés des acides aminés ayant une configuration D et/ou L,

                  ou un fragment formé d'une séquence d'au moins 5 et préférentiellement 7 acides aminés successifs des  
25 peptides ayant la formule (I) ou (II).

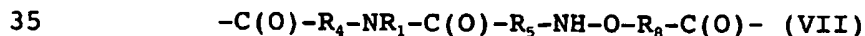
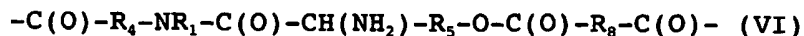
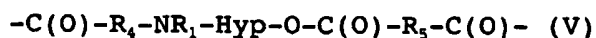
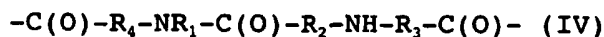
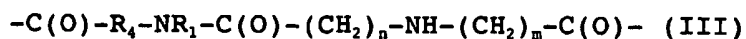
La molécule de cyclosporine peut être liée directement ou indirectement au vecteur peptidique en son extrémité N-terminale ou C-terminale ou par l'une de ses  
30 chaînes latérales. La molécule de cyclosporine peut être liée directement ou indirectement au vecteur peptidique par l'intermédiaire d'un groupe fonctionnel qui est présent naturellement ou inséré soit dans le vecteur soit dans la molécule, ou dans les deux.

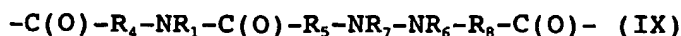
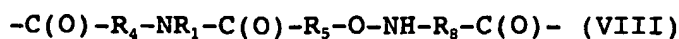
Les groupes fonctionnels tels que -OH, -SH, -COOH, -C(O)H, -C(O)-, -NH<sub>2</sub> peuvent être présents naturellement ou peuvent être insérés dans le vecteur ou dans la molécule de cyclosporine ou dans les deux.

5 Le couplage entre le vecteur peptidique et la molécule de cyclosporine peut être effectué en utilisant toute méthode de couplage acceptable en tenant compte de la nature chimique à la fois du vecteur et de la cyclosporine. Ainsi la liaison entre la molécule de cyclosporine et le  
10 vecteur peptidique peut être choisie parmi les groupes comprenant une liaison covalente, une liaison hydrophobe, une liaison ionique, un linker qui est clivable ou non clivable en milieu physiologique ou à l'intérieur des cellules.

15 Si le couplage est conduit de manière indirecte, un linker (agent de liaison) est utilisé avantageusement. Comme exemples non exhaustifs d'agent de liaison pouvant être utilisés entrant dans la portée de notre invention, nous pouvons mentionner les agents bi- ou  
20 multifonctionnels contenant un alkyl, aryl, alkylaryl ou des groupes peptidiques, esters, amides, amines, alkyl ou aryl ou alkylaryl aldéhydes ou acides, anhydrides, sulfhydriles ou des groupes carboxyles tels que les dérivés d'acide maleymil benzoïque, d'acide maleymil propionique  
25 et les dérivés succinimidyles, groupes dérivés de bromure ou chlorure de cyanogène, carbonyldiimidazole, esters, phosgène, esters de succinimide ou halogénures d'acides sulfoniques.

Un groupe spécifique de linkers comprend la  
30 structure ayant les formules suivantes :





dans lesquelles :

5 n et m sont des entiers indépendants supérieurs ou égaux à 1,

R<sub>1</sub> est H, OR<sub>6</sub>, N(R<sub>6</sub>)R<sub>7</sub>, un alkyl, un aryl, un alkylaryl, un acyl ou un allyl,

10 R<sub>2</sub> et R<sub>3</sub> sont des alkyls dont au moins un est ramifié par un ou deux ou une combinaison d'alkyl, aryl, alkylaryl, acyl, allyl) ou tout autre alkyl ramifié pouvant porter des groupes hétéroatomiques,

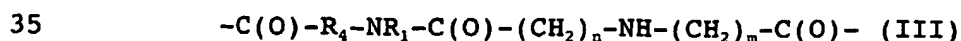
15 R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub> et R<sub>8</sub> sont, indépendamment, des alkyls linéaires (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> ou ramifiés par un ou deux ou une combinaison d'alkyl, aryl, alkylaryl, acyl, allyl ou tout autre alkyl ramifié pouvant porter des groupes hétéroatomiques,

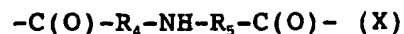
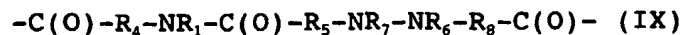
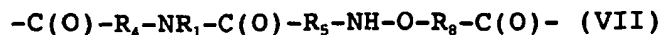
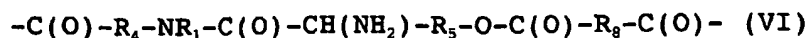
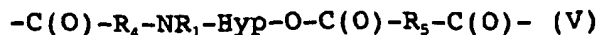
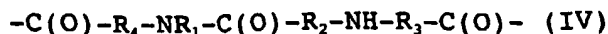
R<sub>6</sub> et R<sub>7</sub> sont, indépendamment H, un alkyl, un aryl, un alkylaryl, un acyl ou un allyl,

20 Hyp-O représente un résidu hydroxyproline où le groupe hydroxy est en position 2, ou 3, ou 4 de la proline, la liaison au reste du bras de liaison se faisant par l'intermédiaire de l'oxygène du groupe hydroxy de l'hydroxyproline,

25 les carbones asymétriques présents dans les groupes R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub> ou Hyp-O pouvant être de configuration R ou S.

La présente invention concerne également les agents de liaison (ou linkers) tels que décrits ci-dessus quelle  
30 que soit la substance active et quel que le vecteur que ledit linker est capable de coupler entre eux et ce, de façon indirecte. Par conséquent, la présente invention concerne un agent de liaison répondant à l'une des formules suivantes :





dans lesquelles :

10 n et m sont des entiers indépendants supérieurs ou égaux à 1,

$R_1$  est H,  $OR_6$ ,  $N(R_6)R_7$ , un alkyl, un aryl, un alkylaryl, un acyl ou un allyl,

15  $R_2$  et  $R_3$  sont des alkyls dont au moins un est ramifié par un ou deux ou une combinaison d'alkyl, aryl, alkylaryl, acyl, allyl) ou tout autre alkyl ramifié pouvant porter des groupes hétéroatomiques,

20  $R_4$ ,  $R_5$  et  $R_8$  sont, indépendamment, des alkyls linéaires  $(CH_2)_n$  ou ramifiés par un ou deux ou une combinaison d'alkyl, aryl, alkylaryl, acyl, allyl ou tout autre alkyl ramifié pouvant porter des groupes hétéroatomiques,

$R_6$  et  $R_7$  sont, indépendamment H, un alkyl, un aryl, un alkylaryl, un acyl ou un allyl,

25 Hyp-O représente un résidu hydroxyproline où le groupe hydroxy est en position 2, ou 3, ou 4 de la proline, la liaison au reste du bras de liaison se faisant par l'intermédiaire de l'oxygène du groupe hydroxy de l'hydroxyproline,

30 les carbones asymétriques présents dans les groupes  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$ ,  $R_5$ ,  $R_6$ ,  $R_7$ ,  $R_8$  ou Hyp-O pouvant être de configuration R ou S.

On préfère les linkers impliquant au moins un pont disulfure en raison de leur stabilité dans le plasma 35 après injection du composé. Une fois les composés objet de

l'invention passés à travers la barrière hémato-encéphalique, ledit pont disulfure est réduit, libérant la molécule de cyclosporine active. Le couplage peut être effectué à n'importe quel site du vecteur peptidique ou de la molécule de cyclosporine.

Ainsi, un mode de réalisation préféré de l'invention concerne un composé consistant en un conjugué comprenant une molécule de cyclosporine, un vecteur peptidique et un linker tel que défini ci-dessus.

Des modes de réalisation additionnels de l'invention fournissent des composés comprenant une molécule de cyclosporine liée à plusieurs vecteurs peptidiques ou à plusieurs molécules de cyclosporine liées à un vecteur peptidique. L'invention mentionne des polymères de tels composés.

L'invention fournit aussi une composition pharmaceutique comprenant au moins un des composés cités ci-dessus.

Un autre sujet de la présente invention est l'utilisation dudit composé pour la création d'une composition pharmaceutique pour le traitement ou la prévention d'une maladie choisie dans le groupe comprenant le traumatisme cérébral, le traumatisme médulaire, l'accident vasculaire cérébral, les maladies d'Alzheimer, de Parkinson, de Huntington, de Charcot de même que les maladies ayant pour cause des désordres neurologiques incluant de manière non exhaustive la démence VIH, la sclérose en plaque, les maladies à prion et les encéphalopathies d'origine infectieuse, toxique et métabolique.

De manière préférentielle, la composition pharmaceutique est de forme appropriée pour l'administration via toute voie convenable incluant la voie orale, sublinguale, buccale, nasale, inhalation, parentérale (incluant la voie intrapéritonéale,

intratissulaire, subcutanée, intradermale, intramusculaire, intra-articulaire, veineuse (centrale, hépatique et périphérique), lymphatique, cardiaque, artérielle, incluant une voie cérébrale artérielle sélective ou suprasélective, la perfusion rétrograde à travers le système veineux cérébral, via un cathéter dans le parenchyme cérébral ou les ventricules), l'exposition directe ou sous pression sur ou à travers le cerveau ou le tissu spinal, ou l'un quelconque du fluide cérébrospinal, des ventricules, des injections dans le subarachnoïde, les espaces cérébraux cisternaux, subduraux ou épiduraux, via les ventricules cérébraux ou une ponction lombaire, une instillation intra et péri-oculaire incluant l'application par injection autour de l'œil, à l'intérieur du globe oculaire, dans ses structures et ses couches, de même que par voie entérale, intestinale, rectale, vaginale, uréthrale, ou la vessie vésicale. Pour les indications *in utero* et périnatale, les injections dans la vascularisation maternelle, ou à travers ou dans les organes maternels, et dans l'embryon, le fœtus, les tissus néonataux et les annexes associées telles que le sac amniotique, le cordon ombilical, l'artère ou les ombilicales et le placenta, la voie parentérale étant la voie préférée. La voie préférée peut varier selon l'état du patient.

Cette invention inclut la possibilité de gérer la durée et la séquence de délivrance des traitements médicamenteux pour y inclure un pré-traitement et un post-traitement, de manière simultanée avec le traitement.

Les cyclosporines vectorisées selon la présente invention sont utilisées chez des patients qui nécessitent une neuroprotection contre des maladies neurologiques de nature aiguë à chronique incluant l'accident vasculaire cérébral, l'hémorragie cérébrale, les traumatismes cérébraux et spinaux, les radiations ionisantes, la chimiothérapie, la neurotoxicité aux structures

vestibulocochléaires, le décollement rétinien et la neurodégénérescence comprenant la sclérose latérale amyotrophique, les maladies de Parkinson et d'Alzheimer.

Les cyclosporines vectorisées sont utilisées  
5 chez des patients qui nécessitent à la fois une neuroprotection contre une maladie neurologique et un état d'immuno-dépression centrale, tel que dans le cas de transplantation neurale, xénotransplantation neurale, sclérose en plaque, neuropathie VIH, lupus érythémateux et  
10 du syndrome de Guillain-Barré.

Les cyclosporines vectorisées sont utilisées chez les patients nécessitant qu'ils soient en état de non-immunité, comme dans le cas de transplantation d'organes et de tissus et de maladies autoimmunes telles que l'arthrite  
15 rhumatoïde.

Les cyclosporines vectorisées sont utilisées chez les patients nécessitant un état de non-immunité de la peau dans le cas de maladies telles que le psoriasis, l'eczéma et l'alopécie.

20 De plus, un autre objet de l'invention est une méthode pour traiter les lésions cérébrales traumatiques, les lésions de la moelle épinière, les accidents vasculaires cérébraux, les maladies d'Alzheimer, de Parkinson, de Huntington, de Charcot de même que les  
25 maladies opportunes dues à des maladies neurologiques incluant de façon non exhaustive la démence VIH, les scléroses multiples, les maladies à prion et les encéphalopathies d'origine infectieuse, toxique et métabolique consistant à administrer à un patient une  
30 composition pharmaceutique contenant au moins un composé vectorisé formé d'une molécule de cyclosporine (le terme « cyclosporines » tel que défini ci-dessus) couplé à un vecteur peptidique, ledit vecteur peptidique étant un dérivé de la famille de la Protégrine ou de la famille de  
35 la Tachyplésine.

### DESCRIPTION DES FIGURES ET EXEMPLES

La présente invention sera mieux comprise en lisant la description du travail expérimental accompli dans le cadre de ses travaux de recherche par la Demanderesse, qui ne doit pas être interprété comme étant de nature restrictive.

Les figures 1 à 13 représentent des schémas réactionnels pour la préparation d'un composé selon l'invention comprenant la cyclosporine et différents vecteurs peptidiques mettant en œuvre différents linkers.

La figure 14 représente la concentration dans le cerveau de produits testés suite à une injection intraveineuse à 2 mg/kg (équivalent en cyclosporine), les produits testés étant la cyclosporine seule, la cyclosporine liée au vecteur peptidique SynB3 par le linker 1 et la cyclosporine liée au vecteur peptidique SynB1 par le linker 1. Les séquences des vecteurs peptidiques SynB1, SynB3 et du linker 1 sont fournis ci-après.

20

#### A. SYNTHÈSE CHIMIQUE DES CONJUGUES.

##### I. Synthèse Chimique de la Cyclosporine vectorisée Csa-linker1-SynB3.

Il sera fait référence à la figure 1 en annexe qui représente schématiquement la synthèse chimique d'un composé vectorisé de la cyclosporine.

##### 1. Synthèse du peptide vecteur.

Le peptide SynB3 de séquence RRLSYSRRRF (SEQ ID NO : 1) est assemblé sur phase solide selon une stratégie Fmoc/tBu, clivé et déprotégé par l'acide trifluoroacétique, puis purifié par chromatographie liquide haute pression (HPLC) préparative en phase inverse et lyophilisé. Sa pureté (>95%) et son identité sont confirmées par HPLC analytique et par spectrométrie de masse.

35

##### 2. Synthèse du conjugué de Cyclosporine A.



De la Cyclosporine A (414 mg -  $n = 344 \mu\text{mol}$ ) et de l'anhydride d'acide chloroacétique ( $m = 500 \text{ mg}$ ) sont mélangés dans 1 ml de pyridine. Chauffé 3h à  $50^\circ\text{C}$ , le mélange obtenu est étendu par 6 ml d'eau. Après extraction  
5 à  $\text{Et}_2\text{O}$ , la phase organique est lavée par une solution de  $\text{NaHCO}_3$  saturée puis à l'eau. La phase étherée séchée sur  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , est concentrée sur évaporateur rotatif donnant 441 mg de cristaux jaunes de chloroacétyl-cyclosporine ( $M+\text{H}^+ = 1279$  - Rdt brut = 100%) qui sont solubilisés dans 1 ml  
10 d'acétonitrile.

Après agitation pendant 14h à  $40^\circ\text{C}$ , en présence de chlorhydrate de benzylamine (2 éq. -  $m = 98 \text{ mg} - 680 \mu\text{mol}$ ), de diisopropyléthylamine (3 éq. -  $177 \mu\text{l} - 1,02 \text{ mmol}$ ) et de  $\text{NaI}$  (0,5 éq. -  $m = 25 \text{ mg} - 170 \mu\text{mol}$ ), le  
15 mélange réactionnel est ensuite concentré sur évaporateur rotatif puis étendu par 7 ml de DMSO et purifié par HPLC préparative pour donner 416 mg de poudre jaune de (2-benzylamino-acétyl)-cyclosporine ( $M+\text{H}^+ = 1351$  -  $M_{\text{sel TFA}} = 1464$  - Rdt = 82%).

20 Un mélange d'acide N-Boc-iminodiacétique ( $m = 11,9 \text{ mg} - 51,1 \mu\text{mol}$ ), de diisopropylcarbodiimide (1 éq. -  $7,9 \mu\text{l} - 51,1 \mu\text{mol}$ ) dans  $400 \mu\text{l}$  de dichlorométhane et  $100 \mu\text{l}$  de DMF est agité à température ambiante pendant 30 minutes. Transféré sur une solution de (2-benzylamino-  
25 acétyl)-cyclosporine ( $68 \text{ mg} - 46,4 \mu\text{mol}$ ), de DIEA (3 éq. -  $23 \mu\text{l} - 139 \mu\text{mol}$ ) dans  $300 \mu\text{l}$  de DMF le produit est agité à température ambiante pendant 3h. On purifie par HPLC préparative et on obtient 62 mg de poudre blanche d'intermédiaire Boc de la cyclosporine ( $M+\text{H}^+ = 1566$  - Rdt  
30 = 85%).

### 3. Couplage de la Cyclosporine A sur SynB3.

Une solution d'intermédiaire Boc de la cyclosporine précédent ( $62 \text{ mg} - 36,9 \mu\text{mol}$ ), de peptide SynB<sub>3</sub> (1,1 éq. -  $84 \text{ mg} - 40,6 \mu\text{mol}$ ), de PyBOP (1,1 éq. -  
35  $21,1 \text{ mg} - 40,6 \mu\text{mol}$ ), DIEA (2 éq. -  $11,5 \mu\text{l} - 73,8 \mu\text{mol}$ )

dans 2 ml de DMF est agité à température ambiante pendant 2h. Le conjugué est purifié par HPLC préparative. On obtient 89,5 mg du conjugué Boc de cyclosporine A ( $M+H^+ = 2941 - M_{\text{sel TFA}} = 3510 - \text{Rdt} = 67\%$ ).

5 Le conjugué Boc (61,5 mg - 17,5  $\mu\text{mol}$ ) est solubilisé dans 540  $\mu\text{l}$  de HCl 4N dans du dioxane et 54  $\mu\text{l}$  de DMF, agité 30 minutes à température ambiante puis purifié par HPLC préparative. On obtient 49 mg de conjugué CsA-linker1-SynB3 ( $M+H^+ = 2841 - M_{\text{sel TFA}} = 3524 - \text{Rdt} = 80\%$ ).

10 Le linker 1 correspond à un linker de formule III telle que définie précédemment dans laquelle n et m sont égaux à 1,  $R_4$  est un groupe alkyl ( $\text{CH}_2$ ) et  $R_1$  est un alkylaryl ( $\text{CH}_2\text{Ph}$ ).

15 II. Synthèse Chimique de la Cyclosporine vectorisée CsA-linker1-SynB3 L/D.

Il sera fait référence à la figure 2 en annexe qui représente schématiquement la synthèse chimique d'un composé vectorisé de la cyclosporine.

20 1. Synthèse du peptide vecteur et de la (2-benzylamino-acétyl)-cyclosporine.

La méthode de synthèse du peptide SynB3 L/D de séquence RRLSYSrrrf (SEQ ID NO : 2) est identique à celle du peptide SynB3 ; la synthèse de la (2-benzylamino-acétyl)-cyclosporine a été décrite précédemment.

25 2. Couplage de la Cyclosporine A sur SynB<sub>3</sub> L/D.

Un mélange d'acide N-Boc-iminodiacétique ( $m = 11,9 \text{ mg} - 51,1 \mu\text{mol}$ ), de diisopropylcarbodiimide (1 éq. - 7,9  $\mu\text{l} - 51,1 \mu\text{mol}$ ) dans 400  $\mu\text{l}$  de dichlorométhane et 100  $\mu\text{l}$  de DMF est agité à température ambiante pendant 30 minutes. Transféré sur une solution de (2-benzylamino-acétyl)-cyclosporine (68 mg - 46,4  $\mu\text{mol}$ ), de DIEA (3 éq. - 23  $\mu\text{l} - 139 \mu\text{mol}$ ) dans 300  $\mu\text{l}$  de DMF le produit est agité à température ambiante pendant 3h.

Le peptide SynB<sub>3</sub> L/D (1,1 éq. - 106 mg - 50,9  $\mu$ mol) mélangé à du PyBOP (1,1 éq. - 26.5 mg - 50,9  $\mu$ mol), de la DIEA (4 éq. - 29  $\mu$ l - 204  $\mu$ mol) et 2,5 ml de DMF est ajouté au mélange précédent puis agité à température ambiante pendant 14h. Le conjugué est purifié par HPLC préparative. On obtient 126 mg du conjugué Boc de cyclosporine A ( $M+H^+$  = 2941 -  $M_{sel\ TFA}$  = 3510 - Rdt = 77%). Le conjugué Boc (103 mg - 35  $\mu$ mol) est solubilisé dans 900  $\mu$ l de HCl 4N dans du dioxane et 90  $\mu$ l de DMF, agité 30 minutes à température ambiante puis purifié par HPLC préparative. On obtient 75 mg de conjugué CsA-linker1-SynB<sub>3</sub> L/D ( $M+H^+$  = 2841 -  $M_{sel\ TFA}$  = 3524 - Rdt = 60%).

### III. Synthèse Chimique de la Cyclosporine vectorisée CsA-linker2-SynB<sub>3</sub>.

Il sera fait référence à la figure 3 en annexe qui représente schématiquement la synthèse chimique d'un composé vectorisé de la cyclosporine.

#### 1. Synthèse du peptide vecteur et de la (Boc-hydrazino-acétyl)-cyclosporine.

Les synthèses du peptide SynB<sub>3</sub> et de la chloroacétyl-cyclosporine ont été décrites précédemment.

De la chloroacétyl-cyclosporine ( $m$  = 130 mg - 100  $\mu$ mol) est solubilisée dans 2 ml d'acétonitrile en présence de tert-Butyl carbazate (1 éq. -  $m$  = 13 mg - 100  $\mu$ mol), de diisopropyléthylamine (4 éq. - 69  $\mu$ l - 400  $\mu$ mol) et de NaI (1 éq. -  $m$  = 15 mg - 100  $\mu$ mol). Le mélange réactionnel est agité à 65°C pendant 24 heures, étendu par 1,5 ml de DMSO et purifié par HPLC préparative pour donner 62 mg de dérivé carbazate de la cyclosporine A ( $M+Na^+$  = 1397 - Rdt = 42%).

#### 2. Synthèse du conjugué de Cyclosporine A.

Un mélange de dérivé carbazate ( $m$  = 45 mg - 30  $\mu$ mol), d'acide N-Boc-iminodiacétique (5 eq. -  $m$  = 35 mg - 150  $\mu$ mol), de PyBroP (5 éq. - 70 mg - 150  $\mu$ mol), de

diisopropyléthylamine (10 éq. - 52  $\mu$ l - 300  $\mu$ mol) dans 75  $\mu$ l de dichlorométhane et 250  $\mu$ l de DMF, est agité à température ambiante pendant 3 jours. On purifie par HPLC préparative et obtient 31 mg de poudre blanche  
5 d'intermédiaire diBoqué de la cyclosporine ( $M+H^+$  = 1590 - Rdt = 65%).

### 3. Couplage de la Cyclosporine A sur SynB<sub>3</sub>.

Une solution d'intermédiaire diBoqué de la cyclosporine (23 mg - 14,4  $\mu$ mol), peptide SynB<sub>3</sub> (1,2 éq. -  
10 36 mg - 17,4  $\mu$ mol), de PyBOP (1,2 éq. - 9 mg - 17,4  $\mu$ mol), DIEA (3 éq. - 7,5  $\mu$ l - 43  $\mu$ mol) dans 600  $\mu$ l de DMF est agité à température ambiante pendant 1h. Le conjugué est purifié par HPLC préparative. On obtient 14 mg de conjugué diBoc de cyclosporine A ( $M+H^+$  = 2968 -  $M_{\text{sel TFA}}$  = 3536 - Rdt = 27%).

15 Le conjugué diBoc (12 mg - 3,4  $\mu$ mol) est solubilisé dans 200  $\mu$ l de DMF et 800  $\mu$ l de TFA. Après agitation à température ambiante pendant 2 heures 30 minutes, le produit est précipité à l'éther diéthylique, centrifugé puis le culot est purifié par HPLC préparative.  
20 On obtient 5,1 mg de conjugué CsA-linker2-SynB<sub>3</sub> ( $M+H^+$  = 2767 -  $M_{\text{sel TFA}}$  = 3564 - Rdt = 42%).

Le linker 2 correspond à un linker de formule III telle que définie précédemment dans laquelle n et m sont égaux à 1, R<sub>4</sub> est un groupe alkyl (CH<sub>2</sub>) et R<sub>1</sub> est de la  
25 forme N(R<sub>6</sub>)R<sub>7</sub> avec R<sub>6</sub> = R<sub>7</sub> = H.

### IV. Synthèse Chimique de la Cyclosporine vectorisée CsA-linker3-SynB<sub>3</sub>.

Il sera fait référence à la figure 4 en annexe  
30 qui représente schématiquement la synthèse chimique d'un composé vectorisé de la cyclosporine.

#### 1. Synthèse du peptide vecteur et de la (2-benzylamino-acétyl)-cyclosporine.

Les synthèses du peptide SynB<sub>3</sub> et de la (2-benzylamino-acétyl)-cyclosporine ont été décrites précédemment.

## 2. Synthèse du conjugué de Cyclosporine A.

5 A un mélange de (2-benzylamino-acétyl)-cyclosporine (m = 85 mg - 58  $\mu$ mol), HATU (2 éq. - 44,1 mg - 116  $\mu$ mol) et DIEA (4 éq. - V = 38  $\mu$ l - 232  $\mu$ mol) dans 425  $\mu$ l de DMF et 425  $\mu$ l de dichlorométhane, on ajoute une solution d'acide glyoxilique hydraté (1 éq. - m = 5,27 mg -  
10 58  $\mu$ mol) dans 425  $\mu$ l de DMF. On agite à température ambiante pendant 12h. Le brut réactionnel est purifié par HPLC préparative. On obtient 47,5 mg de dérivé glyoxylamide de la CsA (M+H<sup>+</sup> = 1406 - M+Na<sup>+</sup> = 1428 - Rdt = 58%).

Un mélange de peptide SynB<sub>3</sub> (m = 150 mg - 72  
15  $\mu$ mol), d'anhydride d'acide chloroacétique (4 éq. - 49 mg - 288  $\mu$ mol) et DIEA (6 éq. - V = 68  $\mu$ l - 432  $\mu$ mol) dans 1 ml de DMF est agité à température ambiante pendant 6h. Le peptide brut est précipité à l'éther diéthylique puis centrifugé. Le solide obtenu est solubilisé dans 400  $\mu$ l de  
20 DMF. On ajoute de l'hydrazine monohydratée (11,4 éq. - 40  $\mu$ l - 825  $\mu$ mol) et agite à température ambiante pendant 3 h. Le mélange réactionnel est purifié par HPLC préparative. On obtient 80 mg de peptide hydrazine (M+H<sup>+</sup> = 1468 - Rdt = 49%).

## 25 3) Couplage de la Cyclosporine A sur SynB<sub>3</sub>.

On solubilise le dérivé glyoxylamide de la CsA (m = 6 mg - 4,2  $\mu$ mol), le peptide hydrazine SynB<sub>3</sub> (1,06 éq. - 25 mg - 4,5  $\mu$ mol) dans 400  $\mu$ l d'une solution de méthanol contenant 1% d'acide acétique. On ajoute du  
30 cyanoborohydrure de sodium (1,4 éq. - 0,4 mg - 6  $\mu$ mol). On agite à température ambiante pendant 3h, ajoute 400  $\mu$ l d'une solution aqueuse contenant 0,1% d'acide trifluoroacétique puis purifie par HPLC préparative. On

obtient 3,5 mg du conjugué CsA-linker3-SynB<sub>3</sub> ( $M+H^+$  = 2856 -  $M_{\text{gel TFA}}$  = 3654 - Rdt = 22%).

Le linker 3 correspond à un linker de formule IX telle que définie précédemment dans laquelle R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub> et R<sub>6</sub> sont des groupes alkyls identiques (CH<sub>2</sub>) et R<sub>1</sub> est un alkylaryl (CH<sub>2</sub>Ph) et R<sub>6</sub> = R<sub>7</sub> = H.

#### V. Synthèse Chimique de la Cyclosporine vectorisée CsA-linker4-SynB<sub>3</sub>.

10 Il sera fait référence à la figure 5 en annexe qui représente schématiquement la synthèse chimique d'un composé vectorisé de la cyclosporine.

##### 1. Synthèse du peptide vecteur et de la (2-benzylamino-acétyl)-cyclosporine.

15 Les synthèses du peptidyl résine SynB<sub>3</sub> et de la (2-benzylamino-acétyl)-cyclosporine ont été décrites précédemment.

##### 2. Synthèse du conjugué de Cyclosporine A.

Un mélange de peptidyl résine SynB<sub>3</sub> (m = 0,8g),  
20 d'anhydride d'acide chloroacétique (170 mg - 1,8 mmol) et DIEA (V = 200 µl - 1,2 mmol) dans 9 ml de DMF est agité à température ambiante pendant 3h. La résine est lavée au DMF et au dichlorométhane. On ajoute sur la résine un mélange de N-hydroxyphtalimide (m = 150 mg - 920 µmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (m =  
25 65 mg - 470 µmol) dans 9 ml de DMF et agite 12h à température ambiante. La résine est lavée au DMF et au dichlorométhane puis on ajoute une solution d'hydrazine 5% dans DMF (V = 9ml) et agite 14h à température ambiante. La résine est lavée au DMF et au dichlorométhane puis le  
30 peptide est clivé à l'acide trifluoroacétique, précipité à l'éther diéthylique puis centrifugé. Après purification par HPLC préparative, on obtient 97 mg de peptide hydroxylamine ( $M+H^+$  = 1469).

Ce dérivé est solubilisé dans une solution d'acide bromoacétique (1 éq - m= 97 mg - 45  $\mu$ mol), DIEA (4 éq. - V = 30  $\mu$ l - 45  $\mu$ mol) dans 1 ml de DMF. On agite à température ambiante pendant 2 jours puis purifie en HPLC préparative. On obtient 28 mg de peptide hydroxylamine alkylé ( $M+H^+$  = 1524 - Rdt = 28%).

On solubilise le dérivé peptidique obtenu dans une solution de di-tbutyl-dicarbonat (6 éq - m= 12 mg - 53  $\mu$ mol), de DIEA (6 éq - V = 9 ml - 53  $\mu$ mol) dans 1 ml de DMF et chauffe 12h à 50°C. On isole le peptide boc (1 à 3 fois) brut par précipitation à l'éther diéthylique puis centrifugation ( $M+H^+$  = 1624 - 1724 -1824 ).

### 3. Couplage de la Cyclosporine A sur SynB<sub>3</sub>.

Une solution de dérivé peptidique boc brut (8,9  $\mu$ mol), de (2-benzylamino-acétyl)-cyclosporine (4,1 éq. - 54 mg - 36,6  $\mu$ mol), de PyBroP (4 éq. - 17 mg - 36,5  $\mu$ mol), de DIEA (8,5 éq. - 13  $\mu$ l - 76  $\mu$ mol) dans 300  $\mu$ l de DMF et 50  $\mu$ l de dichlorométhane, est agitée à température ambiante pendant 14h. On purifie par HPLC préparative et obtient 10 mg du conjugué Boc de cyclosporine A ( $M+H^+$  = 2955 -3055-3155 - Rdt = 32% environ). Le conjugué Boc (10 mg - 2,8  $\mu$ mol) est solubilisé dans 900  $\mu$ l de HCl 4N dans du dioxane et 90  $\mu$ l de DMF. Le produit est purifié par HPLC préparative. On obtient 0,94 mg de conjugué CsA-linker4-SynB<sub>3</sub> ( $M+H^+$  = 2859 -  $M_{sel\ TFA}$  = 3541 - Rdt = 9,5%).

Le linker 4 est un linker de formule générale VII telle que définie précédemment dans laquelle R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub> et R<sub>6</sub> sont des groupes alkyls identiques (CH<sub>2</sub>) et R<sub>1</sub> est un alkylaryl (CH<sub>2</sub>Ph).

30

### VI. Synthèse Chimique de la Cyclosporine vectorisée CsA-linker5-SynB<sub>3</sub>.

Il sera fait référence à la figure 6 en annexe qui représente schématiquement la synthèse chimique d'un composé vectorisé de la cyclosporine.

1. Synthèse du peptide vecteur et de la (2-benzylamino-acétyl)-cyclosporine.

Les synthèses du peptide SynB<sub>3</sub> et du dérivé glyoxylamide de la CsA ont été décrites précédemment.

2. Synthèse du conjugué de Cyclosporine A.

Un mélange de peptide SynB<sub>3</sub> (m = 100 mg - 48 μmol), d'acide N-Fmoc-α-Aminoisobutyrique (6 éq. - 15,6 mg - 48 μmol), PyBOP (1 éq. - 25 mg - 48 μmol) et DIEA (6 éq. - V = 50 μl - 290 μmol) dans 500 μl de DMF est agité à température ambiante pendant 1h. On ajoute 50 μl de pipéridine (6 éq. - V = 50 μl - 290 μmol) et poursuit l'agitation pendant 12h. Le peptide brut est précipité à l'éther diéthylique, centrifugé puis purifié par HPLC préparative. On obtient 77 mg de dérivé peptidique Aib-SynB<sub>3</sub> (M+H<sup>+</sup> = 1480 - M<sub>sel TFA</sub> = 2164 - Rdt = 73%).

3. Couplage de la Cyclosporine A sur SynB<sub>3</sub>.

On solubilise le dérivé glyoxylamide de la CsA (m = 9 mg - 6,4 μmol), le peptide Aib-SynB<sub>3</sub> (1,1 éq. - 15 mg - 6,9 μmol) dans 400 μl d'une solution de méthanol contenant 1% d'acide acétique. On ajoute du cyanoborohydrure de sodium (1,2 éq. - 0,5 mg - 8 μmol). On agite à 45°C pendant 60h, ajoute 100 μl d'une solution aqueuse contenant 0,1% d'acide trifluoroacétique puis on purifie par HPLC préparative. On obtient 5,3 mg du conjugué CsA-linker5-SynB<sub>3</sub> (M+H<sup>+</sup> = 2871 - M<sub>sel TFA</sub> = 3553 - Rdt = 23%).

Le linker 5 est un linker de formule générale IV telle que définie précédemment dans laquelle R<sub>4</sub> et R<sub>2</sub> sont des groupes alkyls linéaires identiques (CH<sub>2</sub>), R<sub>1</sub> est un alkylaryl (CH<sub>2</sub>Ph) et R<sub>3</sub> est un groupe alkyl ramifié par deux alkyls -C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.



VII. Synthèse Chimique de la Cyclosporine vectorisée CsA-linker6-SynB<sub>3</sub>.

Il sera fait référence à la figure 7 en annexe  
5 qui représente schématiquement la synthèse chimique d'un composé vectorisé de la cyclosporine.

1. Synthèse du peptide vecteur et de la (2-benzylamino-acétyl)-cyclosporine.

Les synthèses du peptide SynB<sub>3</sub> et de la (2-  
10 benzylamino-acétyl)-cyclosporine ont été décrites précédemment.

2. Synthèse du conjugué de Cyclosporine A.

Un mélange de peptide SynB<sub>3</sub> (m = 50 mg - 24  
μmol), d'acide N-Boc-Serine (1 éq. - m = 4,9 mg - 24 μmol),  
15 HATU (1 éq. - 9,2 mg - 24 μmol) et DIEA (7 éq. - V = 29 μl - 170 μmol) dans 60 μl de DMF est agité 1h à température ambiante. On ajoute 5 ml d'acide trifluoroacétique, agite à température ambiante pendant 12 heures puis précipite le peptide à l'éther diéthylique. Après centrifugation, on  
20 reprend le résidu dans un tampon phosphate et ajoute du periodate de sodium NaIO<sub>4</sub> (5 éq. - m = 24,6 mg - 120 μmol), agite une heure à température ambiante et purifie par HPLC préparative. On obtient 10,8 mg de dérivé glyoxylamide-SynB<sub>3</sub> (M+H<sup>+</sup> = 1452 - M<sub>rel TFA</sub> = 2022 -Rdt = 22%).

25 Un mélange de (2-benzylamino-acétyl)-cyclosporine (m = 16 mg - 10,9 μmol), d'acide N-Boc-α-aminoisobutyrique (6 éq. - m = 13,2 mg - 65,4 μmol), HATU (8 éq. - 33,2 mg - 87 μmol) et DIEA (6 éq. - V = 11,2 μl - 65,4 μmol) dans 80 μl de DMF est agité à 40°C pendant 60h.  
30 On purifie par HPLC préparative et obtient 7 mg de dérivé Boc-Aib de la CsA (M+H<sup>+</sup> = 1535 - Rdt = 41%). Ce dérivé est solubilisé dans 80 μl de DMF et 200 μl d'une solution d'acide trifluoroacétique et agité une nuit à température ambiante. On dilue par 2 ml d'eau-acétonitrile, lyophilise

et obtient 6mg huile jaune de dérivé Aib de la CsA ( $M+H^+ = 1435 - M_{\text{sel TFA}} = 1549 - \text{Rdt} = 85\%$ ).

### 3. Couplage de la Cyclosporine A sur SynB<sub>3</sub>.

On solubilise le peptide glyoxylamide-SynB<sub>3</sub> (4,2 mg - 2,1  $\mu\text{mol}$ ), le dérivé Aib de la CsA (1,85  $\mu\text{eq} - m = 6 \text{ mg} - 3,9 \mu\text{mol}$ ) dans 145  $\mu\text{l}$  d'une solution de méthanol contenant 1% d'acide acétique et 25  $\mu\text{l}$  de DMF. On ajoute du cyanoborohydrure de sodium (3,8  $\mu\text{eq} - 0,5 \text{ mg} - 8 \mu\text{mol}$ ). On agite à 45°C pendant 60h, ajoute 50  $\mu\text{l}$  d'une solution aqueuse contenant 0,1% d'acide trifluoroacétique puis purifie par HPLC préparative. On obtient 1,1 mg du conjugué CsA-linker6-SynB<sub>3</sub> ( $M+H^+ = 2870 - M_{\text{sel TFA}} = 3553 - \text{Rdt} = 15\%$ ).

Le linker 6 est un linker de formule générale IV telle que définie précédemment dans laquelle R<sub>4</sub> et R<sub>3</sub> sont des groupes alkyls linéaires identiques (CH<sub>2</sub>), R<sub>1</sub> est un alkylaryl (CH<sub>2</sub>Ph) et R<sub>2</sub> est un groupe alkyl ramifié par un alkyl -C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.

## 20 VIII. Synthèse Chimique de la Cyclosporine vectorisée CsA-linker7-SynB<sub>3</sub>.

Il sera fait référence à la figure 8 en annexe qui représente schématiquement la synthèse chimique d'un composé vectorisé de la cyclosporine.

### 25 1. Synthèse du peptide vecteur et de la (2-benzylamino-acétyl)-cyclosporine.

Les synthèses du dérivé glyoxylamide de SynB<sub>3</sub> et de la (2-benzylamino-acétyl)-cyclosporine ont été décrites précédemment.

### 30 2. Synthèse du conjugué de Cyclosporine A.

Un mélange d'acide N-Boc-aminovalérique (10  $\mu\text{eq} - 68 \mu\text{mol} - 15,6 \text{ mg}$ ), de diisopropylcarbodiimide (5  $\mu\text{eq} - 34 \mu\text{mol} - 5,2 \mu\text{l}$ ) est solubilisé dans 180  $\mu\text{l}$  de DMF et 30  $\mu\text{l}$  de dichlorométhane. Après concentration, au solide

repris dans 80  $\mu$ l de DMF, on ajoute de la (2-benzylamino-acétyl)-cyclosporine (1 éq. - m = 10 mg - 6,8  $\mu$ mol), de la diméthylaminopyridine (1 éq. - m = 1 mg - 6,8  $\mu$ mol) et agite à 40°C pendant 48h. On purifie par HPLC préparative et obtient 1,3 mg de dérivé Boc-aminovalérique de la CsA (M+Na<sup>+</sup> = 1424 - Rdt = 13%). Ce dérivé est solubilisé dans 50  $\mu$ l de DMF et 140  $\mu$ l d'une solution d'acide trifluoroacétique et agité 4h à température ambiante. On dilue par 2 ml d'eau-acétonitrile, lyophilise et obtient 0,8 mg de dérivé aminovalérique de la CsA (M+H<sup>+</sup> = 1302 - M<sub>sel TFA</sub> = 1415 - Rdt = 62%).

### 3. Couplage de la Cyclosporine A sur SynB<sub>3</sub>.

On solubilise le peptide glyoxylamide-SynB<sub>3</sub> (8 mg - 3,9  $\mu$ mol), le dérivé aminovalérique de la CsA (1,3 éq. - m = 7,3 mg - 5,2  $\mu$ mol) dans 125  $\mu$ l d'une solution de méthanol contenant 1% d'acide acétique et 7,5  $\mu$ l de DMF. On ajoute du cyanoborohydrure de sodium (1 éq. - 0,2 mg - 3,9  $\mu$ mol). On agite à 45°C pendant 16h, ajoute 500  $\mu$ l d'une solution aqueuse contenant 0,1% d'acide trifluoroacétique puis purifie par HPLC préparative. On obtient 1,8 mg du conjugué CsA-linker7-SynB<sub>3</sub> (M+H<sup>+</sup> = 2737 - M<sub>sel TFA</sub> = 3420 - Rdt = 13%).

Le linker 7 est un linker de formule générale X telle que définie précédemment dans laquelle R<sub>3</sub> = CH<sub>2</sub> et R<sub>4</sub> = (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>.

## IX. Synthèse Chimique de la Cyclosporine vectorisée CsA-linker8-SynB<sub>3</sub>.

Il sera fait référence à la figure 9 en annexe qui représente schématiquement la synthèse chimique d'un composé vectorisé de la cyclosporine.

### 1. Synthèse du peptide vecteur et de la (2-benzylamino-acétyl)-cyclosporine.

La synthèse du dérivé glyoxylamide de la CsA a été décrite précédemment. La méthode de synthèse du peptide Ala-SynB<sub>3</sub> de séquence ARRLSYSRRRF (SEQ ID NO : 3) est identique à celle de SynB3.

5                    2. Couplage de la Cyclosporine A sur SynB<sub>3</sub>.

On solubilise le dérivé glyoxylamide de la CsA (m = 5 mg - 3,5 µmol), le peptide Ala-SynB<sub>3</sub> (1,4 éq. - 10,5 mg - 4,9 µmol) dans 200 µl d'une solution de méthanol contenant 1% d'acide acétique. On ajoute du  
10 cyanoborohydrure de sodium (3,5 éq. - 0,8 mg - 12,4 µmol). On agite à température ambiante pendant 12h, ajoute 100 µl d'eau puis purifie par HPLC préparative. On obtient 1 mg du conjugué CsA-linker8-SynB3 (M+H<sup>+</sup> = 2855 - M<sub>sol TFA</sub> = 3539 - Rdt = 8%).

15                    Le linker 8 est un linker de formule générale IV telle que définie précédemment dans laquelle R<sub>4</sub> et R<sub>2</sub> sont des groupes alkyls linéaires identiques (CH<sub>2</sub>), R<sub>1</sub> est un alkylaryl (CH<sub>2</sub>Ph) et R<sub>3</sub> est un groupe alkyl ramifié par un alkyl -CH(CH<sub>3</sub>).

20

X. Synthèse Chimique de la Cyclosporine vectorisée CsA-linker9-SynB<sub>3</sub>.

Il sera fait référence à la figure 9 en annexe qui représente schématiquement la synthèse chimique d'un  
25 composé vectorisé de la cyclosporine.

1. Synthèse du peptide vecteur et de la (2-benzylamino-acétyl)-cyclosporine.

La synthèse du dérivé glyoxylamide de la CsA a été décrite précédemment. La méthode de synthèse du peptide  
30 βAla-SynB3 de séquence βAla-RRLSYSRRRF (SEQ ID NO : 4) est identique à celle de SynB3.

2. Couplage de la Cyclosporine A sur SynB<sub>3</sub>.

On solubilise le dérivé glyoxylamide de la CsA (m = 6,7 mg - 4,7 µmol), le peptide βAla-SynB3 (1,5 éq. -

15 mg - 7  $\mu$ mol) dans 300  $\mu$ l d'une solution de méthanol contenant 1% d'acide acétique. On ajoute du cyanoborohydrure de sodium (3,5 éq. - 3,5 mg - 16,4  $\mu$ mol). On agite à température ambiante pendant 12h, ajoute 100  $\mu$ l  
5 d'eau puis purifie par HPLC préparative. On obtient 2 mg du conjugué CsA-linker9-SynB<sub>3</sub> ( $M+H^+$  = 2856 -  $M_{\text{sel TFA}}$  = 3539 - Rdt = 12%).

Le linker 9 est un linker de formule générale III telle que définie précédemment dans laquelle R<sub>4</sub> est un  
10 groupes alkyl linéaire (CH<sub>2</sub>), R<sub>1</sub> est un alkylaryl (CH<sub>2</sub>Ph), n = 1 et m = 2.

#### XI. Synthèse Chimique de la Cyclosporine vectorisée CsA-linker 10-SynB<sub>3</sub>.

15 Il sera fait référence à la figure 10 en annexe qui représente schématiquement la synthèse chimique d'un composé vectorisé de la cyclosporine.

##### 1. Synthèse du peptide vecteur et de la (2-benzylamino-acétyl)-cyclosporine.

20 Les synthèses du peptide SynB3 et de la (2-benzylamino-acétyl)-cyclosporine ont été décrites précédemment.

##### 2. Synthèse du conjugué de Cyclosporine A.

Un mélange de (2-benzylamino-acétyl)-  
25 cyclosporine (m = 52,8 mg - 36  $\mu$ mol), N-Boc-serine (1,2 éq. - m = 8,9 mg - 43  $\mu$ mol), HATU (1,2 éq. - 16,4 mg - 43  $\mu$ mol) et DIEA (3 éq. - V = 18,8  $\mu$ l - 108  $\mu$ mol) dans 150  $\mu$ l de DMF est agité à température ambiante pendant 6h. On ajoute alors de l'anhydride succinique (4 éq. - m = 14,4 mg - 144  
30  $\mu$ mol), de la DIEA (2 éq. - 12,5  $\mu$ l - 72  $\mu$ mol) et de la DMAP (1,2 éq - m = 5,2 mg - 43  $\mu$ mol). Le mélange est agité à température ambiante pendant 12h. Le brut réactionnel est purifié par HPLC préparative. On obtient 24 mg de dérivé

succinylé de la CsA ( $M+H^+ = 1638$  -  $M+Na^+ = 1660$  - Rdt = 40%).

### 3. Couplage de la Cyclosporine A sur SynB<sub>3</sub>.

On solubilise le dérivé succinylé de la CsA ( $m = 14,3$  mg -  $8,7$   $\mu$ mol) dans  $200$   $\mu$ l de DMF, ajoute le peptide SynB<sub>3</sub> ( $1,3$  éq. -  $23$  mg -  $11$   $\mu$ mol), du PyBOP ( $1,3$  éq. -  $7,5$  mg -  $11$   $\mu$ mol), de la DIEA ( $3$  éq. -  $4,5$   $\mu$ l -  $26$   $\mu$ mol). On agite à température ambiante pendant  $2h$ . On ajoute  $800$   $\mu$ l de TFA. Après agitation à température ambiante pendant  $30$  minutes, le produit est précipité à l'éther diéthylique, centrifugé puis le culot est purifié par HPLC préparative. On obtient  $21$  mg de conjugué CsA-linker10-SynB3 ( $M+H^+ = 2913$  -  $M_{sel\ TFA} = 3597$  - Rdt = 67%).

Le linker 10 est un linker de formule générale VI telle que définie précédemment dans laquelle  $R_4$  et  $R_5$  sont des groupes alkyls linéaires identiques ( $CH_2$ ),  $R_8$  est un groupe alkyl linéaire ( $CH_2$ )<sub>2</sub>,  $R_1$  est un alkylaryl ( $CH_2Ph$ ).

## 20 XII. Synthèse Chimique de la Cyclosporine vectorisée CsA-linker11-SynB<sub>3</sub>.

Il sera fait référence à la figure 11 en annexe qui représente schématiquement la synthèse chimique d'un composé vectorisé de la cyclosporine.

### 25 1. Synthèse du peptide vecteur et de la (2-benzylamino-acétyl)-cyclosporine.

Les synthèses du peptide SynB3 et de la (2-benzylamino-acétyl)-cyclosporine ont été décrites précédemment.

### 30 2. Synthèse du conjugué de Cyclosporine A.

Un mélange de (2-benzylamino-acétyl)-cyclosporine ( $m = 50$  mg -  $34,1$   $\mu$ mol), N-Boc-L-trans-4-hydroxyproline ( $1,2$  éq. -  $m = 9,5$  mg -  $41$   $\mu$ mol), HATU ( $1,2$

éq. - 15,5 mg - 41  $\mu\text{mol}$ ) et DIEA (3 éq. - V = 17,8  $\mu\text{l}$  - 102  $\mu\text{mol}$ ) dans 200  $\mu\text{l}$  de DMF est agité à température ambiante pendant 12h. On ajoute du HATU (0,38 éq. - 5 mg - 13  $\mu\text{mol}$ ) et agite 1h supplémentaire. On ajoute alors de l'anhydride succinique (4 éq. - m = 13,6 mg - 136,4  $\mu\text{mol}$ ), de la DIEA (3 éq. - 23  $\mu\text{l}$  - 139  $\mu\text{mol}$ ) et de la DMAP (1 éq - m = 4,1 mg - 34,1  $\mu\text{mol}$ ). Le mélange est agité à température ambiante pendant 12h. Le brut réactionnel est purifié par HPLC préparative. On obtient 40 mg de dérivé succinylé de la CsA  
10 (M+H<sup>+</sup> = 1665 - M+Na<sup>+</sup> = 1687 - Rdt = 70%).

### 3. Couplage de la Cyclosporine A sur SynB<sub>3</sub>.

On solubilise le dérivé succinylé de la CsA (m = 20 mg - 12  $\mu\text{mol}$ ) dans 600  $\mu\text{l}$  de DMF, ajoute le peptide SynB<sub>3</sub> (1 éq. - 25 mg - 12  $\mu\text{mol}$ ), du PyBOP (1,2 éq. - 7,5 mg - 14,4  $\mu\text{mol}$ ), de la DIEA (3 éq.- 6,2  $\mu\text{l}$  - 36  $\mu\text{mol}$ ). On agite à température ambiante pendant 4h puis purifie par HPLC préparative. On obtient 30 mg du conjugué Boc de cyclosporine A (M+H<sup>+</sup> = 3041 - M<sub>sel TFA</sub> = 3611 - Rdt = 69%).  
15

Le conjugué Boc (19 mg - 5,3  $\mu\text{mol}$ ) est solubilisé dans 300  $\mu\text{l}$  de DMF puis on ajoute 700  $\mu\text{l}$  de TFA. Après agitation à température ambiante pendant 14h, le produit est précipité à l'éther diéthylique, centrifugé puis le culot est purifié par HPLC préparative. On obtient 7,4 mg de conjugué CsA-linker11-SynB3 (M+H<sup>+</sup> = 2941 - M<sub>sel TFA</sub> = 3625 - Rdt = 39%).  
20  
25

Le linker 11 est un linker de formule générale V telle que définie précédemment dans laquelle R<sub>4</sub> est un groupe alkyl linéaire (CH<sub>2</sub>), R<sub>5</sub> est un groupe alkyl linéaire (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> et R<sub>1</sub> est un alkylaryl (CH<sub>2</sub>Ph).

30

### XIII. Synthèse Chimique de la Cyclosporine vectorisée CsA-linker12-SynB<sub>3</sub>.

Il sera fait référence à la figure 12 en annexe qui représente schématiquement la structure chimique du composé vectorisé de la cyclosporine.

1. Synthèse du peptide vecteur et de la (2-benzylamino-acétyl)-cyclosporine.

Les synthèses du peptide SynB3 et de la (2-benzylamino-acétyl)-cyclosporine ont été décrites précédemment.

2. Synthèse du conjugué de Cyclosporine A.

Un mélange de (2-benzylamino-acétyl)-cyclosporine ( $m = 80 \text{ mg} - 56 \text{ } \mu\text{mol}$ ), N-Boc-D-trans-4-hydroxyproline (3 éq. -  $m = 38,6 \text{ mg} - 168 \text{ } \mu\text{mol}$ ), PyBroP (3 éq. -  $79 \text{ mg} - 168 \text{ } \mu\text{mol}$ ) et DIEA (10,3 éq. -  $V = 100 \text{ } \mu\text{l} - 580 \text{ } \mu\text{mol}$ ) dans  $380 \text{ } \mu\text{l}$  de DMF est agité à température ambiante pendant 18h. On ajoute alors de l'anhydride succinique (8 éq. -  $m = 44,8 \text{ mg} - 448 \text{ } \mu\text{mol}$ ) en deux fois sur 24 heures. Le brut réactionnel est purifié par HPLC préparative. On obtient  $55,2 \text{ mg}$  de dérivé succinylé de la CsA ( $M+H^+ = 1662 - \text{Rdt} = 60\%$ ).

3. Couplage de la Cyclosporine A sur SynB<sub>3</sub>.

On solubilise le dérivé succinylé de la CsA ( $m = 55,2 \text{ mg} - 33 \text{ } \mu\text{mol}$ ) dans  $332 \text{ } \mu\text{l}$  de DMF, ajoute le peptide synB<sub>3</sub> (2 éq. -  $104 \text{ mg} - 66 \text{ } \mu\text{mol}$ ), du PyBOP (2 éq. -  $35 \text{ mg} - 66 \text{ } \mu\text{mol}$ ), de la DIEA (8 éq. -  $46,4 \text{ } \mu\text{l} - 264 \text{ } \mu\text{mol}$ ). On agite à température ambiante pendant 14h puis purifie par HPLC préparative. On obtient  $55,5 \text{ mg}$  du conjugué Boc de cyclosporine A ( $M+H^+ = 3040 - M_{\text{sel TFA}} = 3611 - \text{Rdt} = 46\%$ ).

Le conjugué Boc ( $53 \text{ mg} - 14,6 \text{ } \mu\text{mol}$ ) est solubilisé dans  $800 \text{ } \mu\text{l}$  de DMF puis on ajoute  $3 \text{ ml}$  de TFA et  $200 \text{ } \mu\text{l}$  de triisopropylsilane. Après agitation à température ambiante pendant 1h, le produit est précipité à l'éther diéthylique, centrifugé puis le culot est purifié par HPLC préparative. On obtient  $27,6 \text{ mg}$  de conjugué CsA-linker12-SynB3 ( $M+H^+ = 2939 - M_{\text{sel TFA}} = 3625 - \text{Rdt} = 52\%$ ).



XIV. Synthèse Chimique de la Cyclosporine vectorisée CsA-linker13-SynB<sub>3</sub>.

Il sera fait référence à la figure 12 en annexe  
5 qui représente schématiquement la structure chimique du composé vectorisé de la cyclosporine.

1. Synthèse du peptide vecteur et de la (2-benzylamino-acétyl)-cyclosporine.

Les synthèses du peptide SynB<sub>3</sub> et de la (2-benzylamino-acétyl)-cyclosporine ont été décrites  
10 précédemment.

2. Synthèse du conjugué de Cyclosporine A.

Un mélange de (2-benzylamino-acétyl)-cyclosporine (m = 40 mg - 27,3  $\mu$ mol), N-Boc-D-cis-4-  
15 hydroxyproline (2,25 éq. - m = 14,4 mg - 61  $\mu$ mol), PyBOP (3,25 éq. - 42 mg - 110  $\mu$ mol) et DIEA (7,5 éq. - V = 36  $\mu$ l - 210  $\mu$ mol) dans 255  $\mu$ l de DMF est agité à température ambiante pendant 48h. On purifie par HPLC préparative et obtient 9,5 mg de dérivé N-Boc-D-cis-4-hydroxyproline de la  
20 CsA (M+H<sup>+</sup> = 1563 - Rdt = 22%). On solubilise 9 mg de ce dérivé dans 50  $\mu$ l de DMF, ajoute de l'anhydride succinique (3 éq. - m = 1,7 mg - 17  $\mu$ mol), de la DMAP (1 éq - m = 0,7 mg - 5,7  $\mu$ mol). Le mélange est agité à température ambiante pendant 24h.

25 3. Couplage de la Cyclosporine A sur SynB<sub>3</sub>.

On ajoute le peptide SynB<sub>3</sub> (2 éq. - 11,8 mg - 11,4  $\mu$ mol), du PyBOP (2 éq. - 11,8 mg - 11,4  $\mu$ mol), de la DIEA (15 éq.- 15  $\mu$ l - 87  $\mu$ mol). On agite à température ambiante pendant 14h puis purifie par HPLC préparative. On  
30 obtient 4,3 mg du conjugué Boc de cyclosporine A (M+H<sup>+</sup> = 3039 - M<sub>sel TFA</sub> = 3611 - Rdt = 21%).

Le conjugué Boc (1,0 mg - 0,28  $\mu$ mol) est solubilisé dans 11  $\mu$ l de DMF puis on ajoute 3  $\mu$ l de triisopropylsilane et 44  $\mu$ l de TFA. Après agitation à

température ambiante pendant 3h, le produit est précipité à l'éther diéthylique, centrifugé puis le culot est purifié par HPLC préparative. On obtient 0,37 mg de conjugué CsA-linker13-SynB<sub>3</sub> ( $M+H^+$  = 2941 -  $M_{\text{sel TFA}}$  = 3625 - Rdt = 36%).

5

XV. Synthèse Chimique de la Cyclosporine vectorisée CsA-linker14-SynB<sub>3</sub>.

Il sera fait référence à la figure 12 en annexe qui représente schématiquement la structure chimique du composé vectorisé de la cyclosporine.

10

1. Synthèse du peptide vecteur et de la (2-benzylamino-acétyl)-cyclosporine.

Les synthèses du peptide SynB<sub>3</sub> et de la (2-benzylamino-acétyl)-cyclosporine ont été décrites précédemment.

15

2. Synthèse du conjugué de Cyclosporine A.

Un mélange de (2-benzylamino-acétyl)-cyclosporine (m = 80 mg - 54,6  $\mu\text{mol}$ ), N-Boc-L-cis-4-hydroxyproline (6 éq. - m = 76 mg - 328  $\mu\text{mol}$ ), PyBroP (6 éq. - 160 mg - 328  $\mu\text{mol}$ ) et DIEA (10,6 éq. - V = 100  $\mu\text{l}$  - 580  $\mu\text{mol}$ ) dans 380  $\mu\text{l}$  de DMF est agité à température ambiante pendant 48h. On purifie par HPLC préparative et obtient 22 mg de dérivé N-Boc-L-cis-4-hydroxyproline de la CsA ( $M+H^+$  = 1563 - rdt = 25%). On solubilise ce dérivé dans 200  $\mu\text{l}$  de DMF, ajoute de l'anhydride succinique (4 éq. - m = 6 mg - 56  $\mu\text{mol}$ ), de la DIEA (12 éq - m = 30  $\mu\text{l}$  - 174  $\mu\text{mol}$ ). Le mélange est agité à température ambiante pendant 24h.

20

25

3. Couplage de la Cyclosporine A sur SynB<sub>3</sub>.

On ajoute le peptide synB<sub>3</sub> (2 éq. - 58 mg - 28  $\mu\text{mol}$ ), du PyBOP (2 éq. - 14,5 mg - 11,4  $\mu\text{mol}$ ), agite à température ambiante pendant 4h puis purifie par HPLC préparative. On obtient 10 mg du conjugué Boc de cyclosporine A ( $M+H^+$  = 3041 -  $M_{\text{sel TFA}}$  = 3611 - Rdt = 20%).

30

Le conjugué Boc (10mg - 2,7  $\mu$ mol) est solubilisé dans 111  $\mu$ l de DMF puis on ajoute 444  $\mu$ l de TFA et 28  $\mu$ l de triisopropylsilane. Après agitation à température ambiante pendant 2h, le produit est précipité à l'éther diéthylique, centrifugé puis le culot est purifié par HPLC préparative. On obtient 6 mg de conjugué CsA-linker14-SynB<sub>3</sub> ( $M+H^+$  = 2939 -  $M_{sel\ TFA}$  = 3625 - Rdt = 60%).

Les linkers 12 à 14 sont des stéréoisomères du linker 11 décrit ci-dessus.

10

XVI. Synthèse Chimique de la Cyclosporine vectorisée CsA-linker1-SynB<sub>1</sub>.

Il sera fait référence à la figure 9 en annexe qui représente schématiquement la synthèse chimique d'un composé vectorisé de la cyclosporine.

15

1. Synthèse du peptide vecteur et de la (2-benzylamino-acétyl)-cyclosporine.

La méthode de synthèse du peptide Gly-SynB1 de séquence GRGRLSYSRRRFSTSTGR (SEQ ID NO : 5), dérivé du peptide SynB1 de séquence RGGRLSYSRRRFSTSTGR (SEQ ID NO : 6), est identique à celle du peptide synB3. La synthèse de la (2-benzylamino-acétyl)-cyclosporine a été décrite précédemment.

20

2. Couplage de la Cyclosporine A sur SynB<sub>1</sub>.

On solubilise le dérivé glyoxylamide de la CsA (16,2 mg - 11,5  $\mu$ mol), le peptide Gly-SynB1 (1,5 éq. - 50,9 mg - 17  $\mu$ mol) dans 400  $\mu$ l d'une solution de méthanol contenant 1% d'acide acétique et 200  $\mu$ l de DMF. On ajoute du cyanoborohydrure de sodium (1 éq. - 1 mg - 11,5  $\mu$ mol). On agite à 40°C pendant 48h, ajoute 4ml d'eau-acétonitrile puis purifie par HPLC préparative. On obtient 8,6 mg du conjugué CsA-linker1-SynB1 ( $M+H^+$  = 3546 -  $M_{sel\ TFA}$  = 4344 - Rdt = 18%).

25

30

XVII. Synthèse Chimique de la Cyclosporine vectorisée CsA-linker15-SynB<sub>3</sub>.

Il sera fait référence à la figure 13 en annexe qui représente schématiquement la synthèse chimique d'un composé vectorisé de la cyclosporine.

1. Synthèse du dérivé peptidique Cya-MP- SynB<sub>3</sub>.

La synthèse du peptidyl résine SynB<sub>3</sub> a été décrite précédemment.

Un mélange de peptidyl résine SynB<sub>3</sub> (m = 4g - 1 mmol brut), d'acide S-trityl-3-mercaptopropionique sous forme de sel de diisopropyléthylamine (1,5 éq. - 0,72 g - 1,5 mmol), de PyBOP (1,5 éq. - 0,78 g - 1,5 mmol) et de DIEA (2 éq. - V = 350 µl - 2 mmol) dans 35 ml de DMF est agité à température ambiante pendant 3h. La résine est lavée au DMF et au dichlorométhane. Le peptide est clivé à l'acide trifluoroacétique, précipité à l'éther diéthylique puis centrifugé. On obtient 1 g de dérivé peptidique 3-mercaptopropionamide de SynB<sub>3</sub> (M+H<sup>1+</sup> = 1483). On le solubilise dans 3 ml de DMF et y ajoute une solution de dithiodipyridine (3 éq. - 0,66 g - 3 mmol) dans 10 ml de DMF et agite pendant 3 h. On ajoute alors une solution d'hydrochlorure de cystéamine (4 éq. - 0,45 g - 4 mmol) et agite deux jours à température ambiante. Le peptide est précipité à l'éther diéthylique puis centrifugé. Le résidu solide est purifié par HPLC préparative et on obtient 560 mg de dérivé peptidique Cya-MP-SynB<sub>3</sub> (M+H<sup>1+</sup> = 1561 - M<sub>sel TFA</sub> = 2244 - Rdt = 25%).

2. Couplage de la Cyclosporine A sur SynB<sub>3</sub>.

On solubilise la CsA (100 mg - 83,2 µmol) dans 16 ml d'une solution de phosgène à 20% dans le toluène et agite à température ambiante pendant 4 jours. On concentre le milieu réactionnel sur évaporateur rotatif puis solubilise le résidu solide dans 2 ml de DMF. On ajoute le dérivé peptidique Cya-MP-SynB<sub>3</sub> (0,81 éq. - 152 mg - 68

$\mu\text{mol}$ ), de la DIEA (1,4 éq.  $-20 \mu\text{l}$  -  $116 \mu\text{mol}$ ) et agite à température ambiante pendant 3h. On purifie par HPLC préparative et obtient 80 mg du conjugué CsA-linker15-SynB<sub>3</sub> ( $M+H^+ = 2790$  -  $M_{\text{sel TPA}} = 3359$  - Rdt = 35%).

- 5 Le linker 15 est un dérivé du phosgène avec un groupe alkyl incluant un pont disulfure.

## B. TESTS DES COMPOSES.

### I. Composés testés.

- 10 Les composés testés sont donnés dans le tableau 1 ci-dessous.

Composé	Structure
CsA	Cyclosporine A
CsA-linker1-SynB3	Cyclosporine A-linker1-RRLSYSTRRF
CsA-linker2-SynB3	Cyclosporine A-linker2-RRLSYSTRRF
CsA-linker3-SynB3	Cyclosporine A-linker3-RRLSYSTRRF
CsA-linker4-SynB3	Cyclosporine A-linker4-RRLSYSTRRF
CsA-linker5-SynB3	Cyclosporine A-linker5-RRLSYSTRRF
CsA-linker6-SynB3	Cyclosporine A-linker6-RRLSYSTRRF
CsA-linker7-SynB3	Cyclosporine A-linker7-RRLSYSTRRF
CsA-linker8-SynB3	Cyclosporine A-linker8-RRLSYSTRRF
CsA-linker9-SynB3	Cyclosporine A-linker9-RRLSYSTRRF
CsA-linker10-SynB3	Cyclosporine A-linker10-RRLSYSTRRF
CsA-linker11-SynB3	Cyclosporine A-linker11-RRLSYSTRRF
CsA-linker1-SynB3 L/D	Cyclosporine A-linker1-RRLSYStrrf
CsA-linker1-SynB1	CyclosporineA-linker1-RGGRLSYSTRRFSTSTGR

Tableau 1 : Composés testés

- 15 II. Essais de Cinétique de libération de la Cyclosporine A native.

### 1. Libération dans un tampon phosphate.

- Le conjugué testé est solubilisé à une concentration finale de  $10 \mu\text{M}$  dans un tampon phosphate 10  
 20 mM de pH 7,5 additionné de 30% d'acétonitrile. On réalise

une cinétique de libération de la cyclosporine A par le conjugué à 37°C, en prélevant une partie de la solution à un temps choisi et en l'analysant par une chromatographie HPLC couplée à un spectromètre de masse tandem (mode d'ionisation électrospray). En s'appuyant sur une courbe de calibration, l'intensité de la transition 1203,3 > 675,6 représentative de la cyclosporine A, permet de calculer la quantité de cyclosporine présente dans chaque échantillon. On peut ainsi tracer les courbes représentant la quantité de cyclosporine A libérée en fonction du temps d'incubation du conjugué dans le tampon. Un temps de demi-libération de la quantité de CsA (temps où 50% de la CsA libre est relarguée du produit vectorisé) est ensuite estimé pour le conjugué testé.

## 2. Résultats.

Les temps de demi-libération estimés sont présentés dans le tableau 2 ci-dessous :

Composé testé	T 1/2 libération (en heure)
CsA-linker1-SynB3	0,83
CsA-linker2-synB3	3
CsA-linker3-SynB3	8
CsA-linker4-SynB3	>20
CsA-linker5-SynB3	>48
CsA-linker6-SynB3	>18
CsA-linker7-SynB3	>48
CsA-linker8-SynB3	>48
CsA-linker9-SynB3	4,7
CsA-linker10-SynB3	48
CsA-linker11-SynB3	1,5

Tableau 2 : Temps de demi-libération estimés

Les conjugués testés libèrent la cyclosporine A avec des vitesses qui diffèrent selon le linker présent dans le conjugué. Le choix du linker permet donc de moduler

la vitesse de libération de la cyclosporine A dans un tampon aqueux proche d'un milieu biologique.

### III. Essais de Perfusion cérébrale.

#### 5 1. Perfusion cérébrale *in situ*.

Des souris (20-25 g, Iffa-Credo ; l'Arbresle, France) sont anesthésiées. Après exposition de la carotide commune, l'artère carotide externe droite est liée au niveau de la bifurcation avec la carotide interne et la  
10 carotide commune est liée entre le cœur et le site d'implantation du cathéter (cathéter polyéthylène, ID :0.76). Celui-ci, préalablement rempli par une solution d'héparine (100 unités/ml) est inséré dans la carotide commune. Les souris sont perfusées avec le tampon de  
15 perfusion (128 mM NaCl, 24 mM NaHCO<sub>3</sub>, 4.2 mM KCl, 2.4 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.9 mM MgSO<sub>4</sub>, et 9 mM D-glucose). Ce tampon est filtré puis bullé par un mélange contenant 95% O<sub>2</sub>/ 5% CO<sub>2</sub> afin de maintenir le pH proche de 7.4 et d'alimenter le cerveau en oxygène au cours de la perfusion.

20 Les souris sont perfusées avec le tampon contenant la cyclosporine A libre ou la cyclosporine A vectorisée. La cyclosporine A est marquée au tritium 3H (activité spécifique 20 Ci/mol). Juste avant le début de la perfusion, le cœur est arrêté par section des ventricules,  
25 ceci afin d'éviter au cours de la perfusion un reflux du perfusé. L'hémisphère droit est alors perfusé à une vitesse de 2,5 ml/min pendant 60 secondes après quoi la souris est décapitée. La quantité de radioactivité dans l'hémisphère droit est alors mesurée et la pénétration  
30 cérébrale (Kin) est calculée.

#### 2. Résultats.

##### a. Tolérance des produits.

L'effet des produits testés sur l'intégrité de  
35 la BHE a été observé, grâce au volume de distribution du

[14C]-sucrose, qui est une petite molécule ne pénétrant pas dans le système nerveux central pour des temps d'exposition courts. On estime que ce volume ne doit pas excéder 20  $\mu\text{l/g}$ . Au delà, on conclut à une perméabilité anormale de la BHE. Les composés testés ont été injectés en présence de sucrose et l'intégrité de la BHE est mesurée. Le tableau 3 ci-dessous rapporte l'effet de la perfusion des produits sur l'intégrité de la BHE. Toutes les valeurs obtenues étant inférieures à 20  $\mu\text{l/g}$ , indiquent que les composés ne provoquent pas d'ouverture anormale de la BHE aux doses utilisées. Dans le tableau 3, SEM indique la valeur de « standard error mean » et n indique le nombre d'animaux testés.

Composés testés	Dose perfusée nmol	V ( $\mu\text{l/g}$ )	SEM	n
CsA	18,7	18,2	0,2	5
CsA-linker1-SynB3	18,7	19,3	1,3	4
CsA-linker1-SynB3 L/D	18,7	20,1	5,9	5
CsA-linker1-SynB1	7,5	15,5	1,8	2

Tableau 3 : Volume de distribution du [14C-sucrose]

#### b. Pénétration des produits.

Dans cette étude, nous avons comparé la pénétration dans la BHE de la cyclosporine A libre avec la cyclosporine A vectorisée. Pour suivre le passage des produits à travers la barrière hémato-encéphalique, nous avons utilisé de la cyclosporine A préalablement marquée au tritium  $^3\text{H}$  (activité spécifique de 20 Ci/mol).

La cyclosporine A libre et la cyclosporine A vectorisée sont ensuite perfusées dans le cerveau de la souris. Après 60 secondes de perfusion dans le tampon, la pénétration des produits est estimée par la constante d'influx ou  $K_{in}$  en  $\mu\text{l/sec/g}$ . Le tableau 4 ci-dessous montre que la vectorisation de la cyclosporine A par les vecteurs augmente son passage dans le cerveau d'environ 2 à 4 fois



après une perfusion de 60 secondes dans du tampon. Dans le tableau 4, SEM indique la valeur de « standard error mean » et n indique le nombre d'animaux testés.

Composé testé	Kin ( $\mu\text{l/s/g}$ )	SEM	n
CsA	2,5	0,8	5
CsA-linker1-SynB3	10,1	4,4	4
CsA-linker1-SynB3 L/D	6,1	1,3	5
CsA-linker1-SynB1	5,0	0,3	2

5 Tableau 4: Constante d'influx Kin en  $\mu\text{l/sec/g}$

### III. Essais de Pharmacocinétiques iv de la Cyclosporine A native et vectorisées.

#### 10 1. Pharmacocinétiques après injections intraveineuses.

L'étude du passage d'une substance au travers de la BHE nécessite l'emploi de plusieurs approches complémentaires. La perfusion cérébrale permet des mesures sur des temps très courts. L'injection intraveineuse permet  
 15 une évaluation globale des pharmacocinétiques chez l'animal sur des temps longs. La molécule radioactive est introduite dans la circulation sanguine et se distribue dans l'organisme. Une certaine quantité de cette molécule pénètre dans le cerveau où sa concentration est mesurée à  
 20 des temps déterminés.

#### 2. Résultats pharmacocinétiques iv.

Les souris sont injectées par voie intraveineuse avec le composé à une dose de 0,7 mg/kg  
 25 (équivalent en Cyclosporine A). La Cyclosporine A est marquée au tritium (activité spécifique 20 Ci/mol).

Après 5,30 et 120 minutes, les souris sont sacrifiées. Nous avons utilisé 3 souris par temps. Les organes sont ensuite prélevés et comptés. La quantité de radioactivité dans chaque organe est ensuite exprimée en

quantité de produit (équivalent en cyclosporine) par gramme d'organe. Les quantités de produit mesurées dans le cerveau sont indiquées dans le tableau 5 ci-dessous.

Groupe	Composé	Temps (min)	Quantité de produit (nmol/g cerveau)
1	CsA	5	0,029
		30	0,021
		120	0,016
2	CsA-linker1-SynB3	5	0,069
		30	0,039
		120	0,012
3	CsA-linker1-SynB3 L/D	5	0,083
		30	0,038
		120	0,012

**Tableau 5** : Quantités de produit mesurées dans le cerveau après injections intraveineuses à 0,7 mg/kg équivalent

Dans une autre expérience, les souris sont injectées par voie intraveineuse avec le composé à une dose de 2 mg/kg (équivalent en Cyclosporine A). La Cyclosporine A est marquée au tritium (activité spécifique 5 Ci/mol). Les quantités de produit mesurées dans le cerveau sont indiquées dans le tableau 6 ci-dessous.

Groupe	Composé	Temps (min)	Quantité de produit (nmol/g cerveau)
1	CsA	5	0,036
		30	0,040
		120	0,019
2	CsA-linker1-SynB3	5	0,141
		30	0,092
		120	0,038
3	CsA-linker1-SynB1	5	0,127
		30	0,079
		120	0,017

**Tableau 6** : Quantités de produit mesurées dans le cerveau après injections intraveineuses à 2 mg/kg équivalent

Les quantités de produit mesurées dans le cerveau après injections intraveineuses à une dose de 2 mg/kg (équivalent en Cyclosporine A) sont représentées dans la figure 14.

La vectorisation a permis d'améliorer de façon significative le passage de la Cyclosporine A à travers la barrière hémato-encéphalique. Cette accumulation est observée non seulement pour des temps courts mais aussi  
5 pour des temps longs allant jusqu'à 2 heures post-administration.

REFERENCES

- 4,117.118 Harri et al. Organic compounds.
- 5,972.924 Keep et al. Treatment of cerebral ischemia and cerebral damage.
- PCT/US98/20040 Keep and Elmér. Selective
- 5 neuronal radioprotection.
- Begley, D. J., Squires, L. K., Zlokovic, B. V., Mitrovic, D. M., Hughes, C. C., Revest, P. A. and Greenwood, J. (1990) Permeability of the blood brain barrier to the immunosuppressive cyclic peptide cyclosporin
- 10 A. J. Neurochem. 55, 1222-1230.
- Bernardi, P. (1996) The permeability transition pore. Control points of a cyclosporin A- sensitive mitochondrial channel involved in cell death. Biochim Biophys Acta 1275, 5-9.
- 15 Bernardi, P., Colonna, R., Costantini, P., Eriksson, O., Fontaine, E., Ichas, F., Massari, S., Nicolli, A., Petronilli, V. and Scorrano, L. (1998) The mitochondrial permeability transition. Biofactors 8, 273-81.
- 20 Borlongan, C. V., Stahl, C. E., Keep, M. F., Elmer, E. and Watanabe, S. (2000) Cyclosporine-A enhances choline acetyltransferase immunoreactivity in the septal region of adult rats. Neurosci Lett 279, 73-6.
- Friberg, H., Ferrand-Drake, M., Bengtsson, F.,
- 25 Halestrap, A. P. and Wieloch, T. (1998) Cyclosporin A, but not FK 506, protects mitochondria and neurons against hypoglycemic damage and implicates the mitochondrial permeability transition in cell death. J. Neurosci. 18, 5151-9.
- 30 Keep, M., Elmér, E., Fong, K. and Csiszar, K. (2001) Intrathecal cyclosporin prolongs survival of late-stage ALS mice. Brain Research 894, 327-31.

- Lensmeyer, G. L., Wiebe, D. A., Carlson, I. H. and Subramanian, R. (1991) Concentrations of cyclosporin A and its metabolites in human tissues postmortem. *J. Anal. Toxicol.* 15, 110-5.
- 5 Kokryakov, V. N., Harwig S. S., Panyutich E.A., Shevchenko A.A., Aleshina G.M., Shamova O.V., Korneva H.A., Lehrer R.I. (1993) Protegrins: leukocyte antimicrobial peptides that combine features of corticostatic defensins and tachyplesins. *Febs Let.* 327, 231-236
- 10 Leventhal, L., Sortwell, C. E., Hanbury, R., Collier, T. J., Kordower, J. H. and Palfi, S. (2000) Cyclosporin A protects striatal neurons in vitro and in vivo from 3-nitropropionic acid toxicity. *J. Comp. Neurol.* 425, 471-8.
- 15 Li, P. A., Uchino, H., Elmér, E. and Siesjö, B. K. (1997) Amelioration by cyclosporin A of brain damage following 5 or 10 min of ischemia in rats subjected to preischemic hyperglycemia. *Brain Res.* 753, 133-40.
- Liu, J., Farmer, J. D., Jr., Lane, W. S.,  
20 Friedman, J., Weissman, I. and Schreiber, S. L. (1991) Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 66, 807-15.
- Mazel, M, clair, P, Rousselle, C, Vidal, P, Scherrmann, JM, Mathieu, D and Temsamani, J. (2001)  
25 Doxorubicin-peptide conjugates overcome multidrug resistance. *Anti-Cancer Drugs* 12, 107-116.
- Miyata, K., Omori, N., Uchino, H., Yamaguchi, T., Isshiki, A. and Shibasaki, F. (2001) Involvement of the brain-derived neurotrophic factor/TrkB pathway in  
30 neuroprotective effect of cyclosporin A in forebrain ischemia. *Neuroscience* 105, 571-8.
- Okonkwo, D. O., Buki, A., Siman, R. and Povlishock, J. T. (1999) Cyclosporin A limits calcium-induced axonal damage following traumatic brain injury.  
35 *NeuroReport* 10, 353-8.

- Okonkwo, D. O. and Povlishock, J. T. (1999) An intrathecal bolus of cyclosporin A before injury preserves mitochondrial integrity and attenuates axonal disruption in traumatic brain injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 19, 443-51.
- Petersen, A., Castilho, R. F., Hansson, O., Wieloch, T. and Brundin, P. (2000) Oxidative stress, mitochondrial permeability transition and activation of caspases in calcium ionophore A23187-induced death of cultured striatal neurons. *Brain Res.* 857, 20-9.
- Rousselle, C., Clair, P., Lefauconnier, J.M., Kaczorek, M., Scherrmann, J.M. and Temsamani, J (2000) New advances in the transport of Doxorubicin through the blood-brain barrier by a peptide-vector mediated strategy. *Molecular Pharmacology.* 57, 679-686.
- Rousselle, C., Smirnova, M., Clair, P., Lefauconnier, J.M., Chavanieu, A., Calas, B., Scherrmann, J.M. and Temsamani, J. (2001) Enhanced delivery of doxorubicin into the brain via a peptide-vector mediated strategy: saturation kinetics and specificity. *J. Pharmacol Exp. Ther.* 296, 124-131.
- Sakata, A., Tamai, I., Kawazu, K., Deguchi, Y., Ohnishi, T., Saheki, A., Tsuji, A. (1994) *In vivo* evidence for ATP-dependent and P-glycoprotein mediated transport of Cyclosporin A at the blood brain barrier. *Biochem Pharmacol.* 48, 1989-1992.
- Scheff, S. W. and Sullivan, P. G. (1999) Cyclosporin A significantly ameliorates cortical damage following experimental traumatic brain injury in rodents. *J. Neurotrauma* 16, 783-92.
- Sullivan, P. G., Rabchevsky, A. G., Hicks, R. R., Gibson, T. R., Fletcher-Turner, A. and Scheff, S. W. (2000a) Dose-response curve and optimal dosing regimen of cyclosporin A after traumatic brain injury in rats. *Neuroscience* 101, 289-95.

- Sullivan, P. G., Thompson, M. and Scheff, S. W. (2000b) Continuous infusion of cyclosporin A postinjury significantly ameliorates cortical damage following traumatic brain injury. *Exp. Neurol.* 161, 631-637.
- 5 Sullivan, P. G., Thompson, M. B. and Scheff, S. W. (1999) Cyclosporin A attenuates acute mitochondrial dysfunction following traumatic brain injury. *Exp. Neurol.* 160, 226-34.
- Tamura, H. et al. (1993) *Chem. Pharm. Bul.* 10 Tokyo 41, 978-980.
- Temsamani, J., Rousselle, C, Rees, AR, Scherrmann, JM (2001) Vector-Mediated Drug Delivery to the brain. *Expert Opinion on Biological Therapy* 1, 773-782.
- Temsamani, J., Scherrmann, J.M., Rees A.R. and 15 Kaczorek M. (2000) Brain drug delivery technology: Novel approaches for transporting therapeutics (invited paper). *J. Pharmaceutical & Science Technology Today* 3, 155-162.
- Tsuji, A., Tamai, I., Sakata, A., Tenda, Y., Terasaki, T., (1993) Restricted transport of cyclosporin A 20 across the blood brain barrier by a multidrug transporter, P-glycoprotein. *Biochem Pharmacol.* 46, 1096-1099.
- Uchino, H., Elmér, E., Uchino, K., Li, P. A., He, Q. P., Smith, M. L. and Siesjö, B. K. (1998) Amelioration by cyclosporin A of brain damage in transient 25 forebrain ischemia in the rat. *Brain Res.* 812, 216-26.
- Uchino, H., Elmér, E., Uchino, K., Lindvall, O. and Siesjö, B. K. (1995) Cyclosporin A dramatically ameliorates CA1 hippocampal damage following transient forebrain ischaemia in the rat. *Acta Physiol. Scand.* 155, 30 469-471.
- Yoshimoto, T. and Siesjö, B. K. (1999) Posttreatment with the immunosuppressant cyclosporin A in transient focal ischemia. *Brain Res.* 839, 283-91.

## REVENDICATIONS

1) Un composé qui comprend au moins une molécule de cyclosporine et au moins un vecteur peptidique capable de transporter ladite molécule à travers la barrière hémato-encéphalique.

2) Le composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la molécule de cyclosporine est la Cyclosporine A.

10

3) Le composé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que le vecteur peptidique est un peptide linéaire ayant pour formule l'une des formules suivantes (I) ou (II) :

15

BX(X ou B)BXXXXBBBXXXXXXB (I)

BXXXBXXXBXXXXBBXB (II)

dans lesquelles :

-les groupes B, identiques ou différents, représentent un résidu d'un acide aminé dont la chaîne latérale porte un groupement basique, et

20

-les groupes X, identiques ou différents, représentent un résidu d'un acide aminé aliphatique ou aromatique,

ou lesdits peptides de formule (I) ou (II), dans leur forme retro ou formés des acides aminés ayant une configuration D et/ou L,

25

ou un fragment formé d'une séquence d'au moins 5, et préférentiellement 7 acides aminés successifs des peptides de la formule (I) ou (II).

30

4) Le composé de la revendication 3, caractérisé en ce que B est choisi parmi le groupe comprenant l'arginine, la lysine, l'acide diaminoacétique,



l'acide diaminobutyrique, l'acide diaminopropionique, l'ornithine.

5) Un composé selon les revendications 3 ou 4,  
5 caractérisé en ce que X est choisi parmi la glycine, l'alanine, la valine, la norleucine, l'isoleucine, la leucine, la cystéine, la <sup>Acn</sup>cystéine, la pénicillamine, la méthionine, la sérine, la thréonine, l'asparagine, la glutamine, la phénylalanine, l'histidine, le tryptophane,  
10 la tyrosine, la proline, l'Abu, l'acide amino -1-cyclohexane carboxylique, l'Aib, le carboxylic 2-aminotétraline, la 4-bromophénylalanine, la tert-Leucine, la 4-chlorophénylalanine, la beta-cyclohexylalanine, la 3,4-dichlorophénylalanine, la 4-fluorophénylalanine,  
15 l'homoleucine, la beta-homoleucine, l'homophénylalanine, la 4-méthylphénylalanine, la 1-naphtyl-alanine, la 2-naphtylalanine, la 4-nitrophenylalanine, la 3-nitrotyrosine, la norvaline, la phenylglycine, la 3-pyridylalanine, la [2-thienyl]alanine.

20

6) Un composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que la molécule de cyclosporine est liée directement ou indirectement au vecteur peptidique en son extrémité N-terminale ou C-  
25 terminale ou par l'une de ses chaînes latérales.

7) Un composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que la molécule de cyclosporine peut être liée directement ou indirectement au  
30 vecteur peptidique par l'intermédiaire d'un groupe fonctionnel qui est présent naturellement ou inséré soit dans le vecteur soit dans la molécule, ou dans les deux.

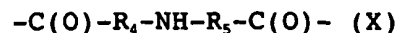
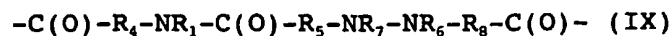
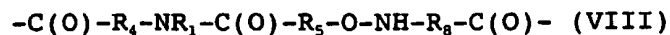
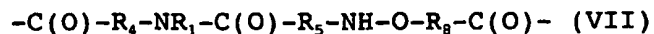
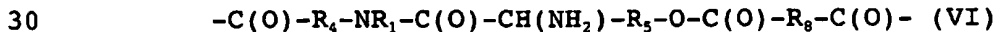
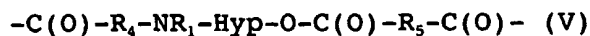
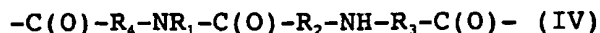
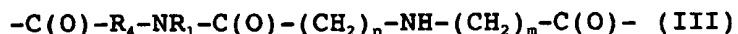
8) Le composé de la revendication 7,  
35 caractérisé en ce que le groupe fonctionnel est choisi

parmi des groupes comprenant -OH, -SH, -COOH, -C(O)H, -C(O)-, -NH<sub>2</sub>.

9) Un composé selon l'une quelconque des  
5 revendications 1 à 8, caractérisé en ce que la liaison  
entre la molécule de cyclosporine et le vecteur peptidique  
peut être choisie parmi les groupes comprenant une liaison  
covalente, une liaison hydrophobe, une liaison ionique, un  
linker qui est clivable ou non clivable en milieu  
10 physiologique ou à l'intérieur des cellules.

10) Un composé selon la revendication 9,  
caractérisé en ce que le linker est choisi dans le groupe  
comprenant les agents bi- ou multifonctionnels contenant un  
15 alkyl, aryl, alkylaryl ou des groupes peptidiques, esters,  
amides, amines, alkyl, aryl ou alkylaryl aldéhydes ou  
acides, anhydrides, sulfhydriles ou des groupes carboxyles  
tels que les dérivés d'acide maleymil benzoïque, acide  
maleymil propionique et les dérivés succinimidyles, groupes  
20 dérivés de bromure ou chlorure de cyanogène,  
carbonyldiimidazole, esters, phosgène, esters de  
succinimide ou halogénures sulfoniques.

11) Un composé selon l'une quelconque des  
25 revendications 9 ou 10, caractérisé en ce que le linker est  
choisi dans les groupes comprenant les formules suivantes :



35 dans lesquelles :

n et m sont des entiers indépendants supérieurs ou égaux à 1,

$R_1$  est H,  $OR_6$ ,  $N(R_6)R_7$ , un alkyl, un aryl, un alkylaryl, un acyl ou un allyl,

5  $R_2$  et  $R_3$  sont des alkyls dont au moins un est ramifié par un ou deux ou une combinaison d'alkyl, aryl, alkylaryl, acyl, allyl) ou tout autre alkyl ramifié pouvant porter des groupes hétéroatomiques,

10  $R_4$ ,  $R_5$  et  $R_8$  sont, indépendamment, des alkyls linéaires  $(CH_2)_n$  ou ramifiés par un ou deux ou une combinaison d'alkyl, aryl, alkylaryl, acyl, allyl ou tout autre alkyl ramifié pouvant porter des groupes hétéroatomiques,

15  $R_6$  et  $R_7$  sont, indépendamment, H, un alkyl, un aryl, un alkylaryl, un acyl ou un allyl,

Hyp-O représente un résidu hydroxyproline où le groupe hydroxy est en position 2, ou 3, ou 4 de la proline, la liaison au reste du bras de liaison se faisant par l'intermédiaire de l'oxygène du groupe hydroxy de  
20 l'hydroxyproline,

les carbones asymétriques présents dans les groupes  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$ ,  $R_5$ ,  $R_6$ ,  $R_7$ ,  $R_8$  ou Hyp-O pouvant être de configuration R ou S.

25 12) Un composé selon l'une quelconque des revendications 9 à 11, caractérisé en ce que la liaison entre le linker et la molécule de cyclosporine et/ou le vecteur peptidique comprend au moins un pont disulfure.

30 13) Une composition pharmaceutique comprenant au moins un composé selon les revendications 1 à 12.

14) Utilisation d'un composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 12 pour la préparation  
35 d'une composition pharmaceutique pour le traitement ou la

prévention des états neurologiques aigus incluant les lésions cérébrales traumatiques, les lésions de la moelle épinière, l'exposition aux radiations, la chimiothérapie, les états épileptiques, la schizophrénie et la chirurgie  
5 cérébrale ou spinale.

15) Utilisation d'un composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 12 pour la préparation d'une composition pharmaceutique pour le traitement ou la  
10 prévention des états neurologiques aigus incluant l'accident vasculaire cérébral, l'accident vasculaire cérébral embolique, l'ischémie globale cérébrale, la rupture d'anévrisme, l'hémorragie subarachnoïde, les spasmes des vaisseaux et l'accident vasculaire cérébral  
15 hémorragique.

16) Utilisation d'un composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 12 pour la préparation d'une composition pharmaceutique pour le traitement ou la  
20 prévention des maladies neurodégénératives comprenant la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la maladie de Huntington, le syndrome de Down, la maladie de Charcot, l'atrophie spino-musculaire, la paralysie bulbaire, la schizophrénie, le syndrome de Tourette, l'atrophie  
25 cérébrale corticale diffuse, la démence à corps de Lewy, la démence mésolimbocorticale, la dégénérescence thalamique, la maladie de Pick, l'atrophie multisystème, la dégénérescence cortico-striato-spinale, le syndrome de Shy-Drager, le syndrome de Richardson-Steele-Olzewski, le  
30 complexe Prakinson-SLA-Démence de Guam, le syndrome post-polio, l'atrophie olivocérébelleuse, l'ataxie de Friedreich, le syndrome paranéoplasique, l'encéphalopathie traumatique chronique (Démence pugilistique), la maladie de Wilson, la maladie de Menke,  
35 la gangliosidose Tay-Sachs et la maladie de Krabbe, la

neuropathie périphérique, la neuropathie diabétique et le vieillissement.

17) Utilisation d'un composé selon l'une  
5 quelconque des revendications 1 à 12 pour la préparation  
d'une composition pharmaceutique pour le traitement ou la  
prévention des maladies à prions incluant la maladie de  
Creutzfeldt-Jacob, la maladie atypique de Creutzfeldt-  
Jacob, le Kuru, la scrapie, et l'encéphalopathie bovine  
10 spongiforme.

18) Utilisation d'un composé selon l'une  
quelconque des revendications 1 à 12 pour la préparation  
d'une composition pharmaceutique pour le traitement ou la  
15 prévention des maladies rétrovirales incluant la démence du  
SIDA, la myélopathie du SIDA, la neuropathie périphérique  
du SIDA, et la paraparésie tropicale.

19) Utilisation d'un composé selon l'une  
20 quelconque des revendications 1 à 12 pour la préparation  
d'une composition pharmaceutique pour le traitement ou la  
prévention des maladies visuelles et rétiniennes incluant  
la dégénérescence relative au glaucome, la dégénérescence  
maculaire, la dégénérescence diabétique, la rétinopathie  
25 diabétique, l'inflammation relative à la dégénérescence, le  
détachement rétinien, les neurites optiques, les lésions du  
nerf optique, du chiasma optique, du tractus optique et les  
lésions rétiniennes causées par les photons, les  
traumatismes, l'ischémie, et l'augmentation de la pression  
30 intracrânienne.

20) Utilisation d'un composé selon l'une  
quelconque des revendications 1 à 12 pour la préparation  
d'une composition pharmaceutique pour le traitement ou la  
35 prévention d'infections virales et bactériennes et

d'encéphalopathies incluant les encéphalites herpétiques, l'encéphalite équine, l'encéphalite post-vaccinatoire, l'encéphalite Japonaise, l'encéphalite Nile, la méningite, la rage, la poliomyélite, la leukoencéphalopathie progressive multifocale, la panencéphalite subaigüe sclérosante, la malaria cérébrale, la maladie de Lyme et la neurosyphilis.

21) Utilisation d'un composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 12 pour la préparation d'une composition pharmaceutique pour le traitement ou la prévention des maladies immunes incluant les scléroses en plaque, le syndrome de Guillain-Barré, le lupus érythémateux et la maladie de Grave.

22) Utilisation d'un composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 12 pour la préparation d'une composition pharmaceutique pour le traitement ou la prévention des effets des neurotoxines incluant les aminoglycosides, les hydrocarbures chlorés, les organophosphates, les insecticides, les herbicides, le paraquat, l'Agent Orange, les gaz innervant, le MPTP, la roténone, le cyanide, le monoxyde de carbone, le méthanol, l'éthanol, le mercure, l'arsenic et les agents de chimiothérapie incluant le méthotrexate, la mercaptopurine, le fluorouracile, les nitrosourées, l'hydroxyurée, le cisplatine, le carboplatine, la daunorubicine, la doxorubicine, l'époside, la vincristine, la vinblastine, le taxol et ses dérivés, le cyclophosphamide, et les corticostéroïdes .

23) Utilisation d'un composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 12 pour la préparation d'une composition pharmaceutique pour le traitement ou la

prévention des encéphalopathies métaboliques incluant l'encéphalopathie hépatique et l'encéphalopathie urémique.

24) Utilisation d'un composé selon l'une  
5 quelconque des revendications 1 à 12 pour la préparation d'une composition pharmaceutique pour le traitement ou la prévention de l'être humain nécessitant un état de non-immunité en vue de la transplantation d'un organe, tissu ou cellulaire, ou pour les maladies autoimmunes et immunes  
10 telles que l'arthrite rhumatoïde, l'eczéma, le psoriasis et l'alopécie.

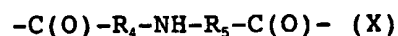
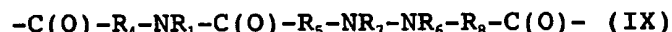
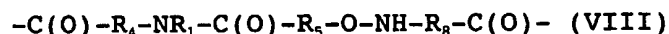
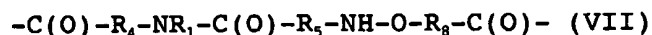
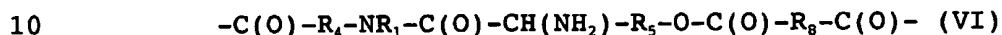
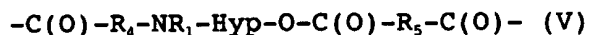
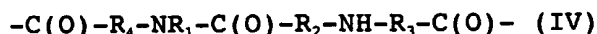
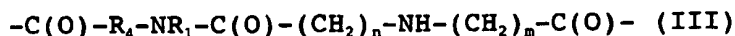
25) Utilisation d'un composé selon l'une  
quelconque des revendications 1 à 12 pour la préparation  
15 d'une composition pharmaceutique pour le traitement chez l'être humain d'une tumeur résistante à la chimiothérapie.

26) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 14 à 25, caractérisée en ce que la  
20 composition pharmaceutique est une forme appropriée pour l'administration par la voie parentérale, la voie intravasculaire, la voie orale, la voie rectale, la voie vaginale, la voie nasale, la voie transdermique, la voie pulmonaire, la voie cérébrospinale, la voie  
25 intracisternale, la voie subarachnoïde, la voie intratéchale, ou directement dans ou sur le parenchyme cérébral.

27) Utilisation selon l'une quelconque des  
30 revendications 14 à 25, caractérisée en ce que la composition pharmaceutique est une forme appropriée pour l'administration par la voie intravasculaire, la voie cérébrospinale, la voie intraventriculaire, la voie intracisternale, la voie subarachnoïde, la voie  
35 intratéchale, ou directement dans ou sur le parenchyme

cérébral, utilisant partiellement ou complètement des appareils tels que ceux à relargage prolongé par injection dépôt, des pompes, des réservoirs ou des catheters.

5 28) Agent de liaison répondant à l'une des formules suivantes :



15 dans lesquelles :

n et m sont des entiers indépendants supérieurs ou égaux à 1,

$R_1$  est H,  $OR_6$ ,  $N(R_6)R_7$ , un alkyl, un aryl, un alkylaryl, un acyl ou un allyl,

20  $R_2$  et  $R_3$  sont des alkyls dont au moins un est ramifié par un ou deux ou une combinaison d'alkyl, aryl, alkylaryl, acyl, allyl) ou tout autre alkyl ramifié pouvant porter des groupes hétéroatomiques,

$R_4$ ,  $R_5$  et  $R_8$  sont, indépendamment, des alkyls  
25 linéaires  $(CH_2)_n$  ou ramifiés par un ou deux ou une combinaison d'alkyl, aryl, alkylaryl, acyl, allyl ou tout autre alkyl ramifié pouvant porter des groupes hétéroatomiques,

$R_6$  et  $R_7$  sont, indépendamment H, un alkyl, un  
30 aryl, un alkylaryl, un acyl ou un allyl,

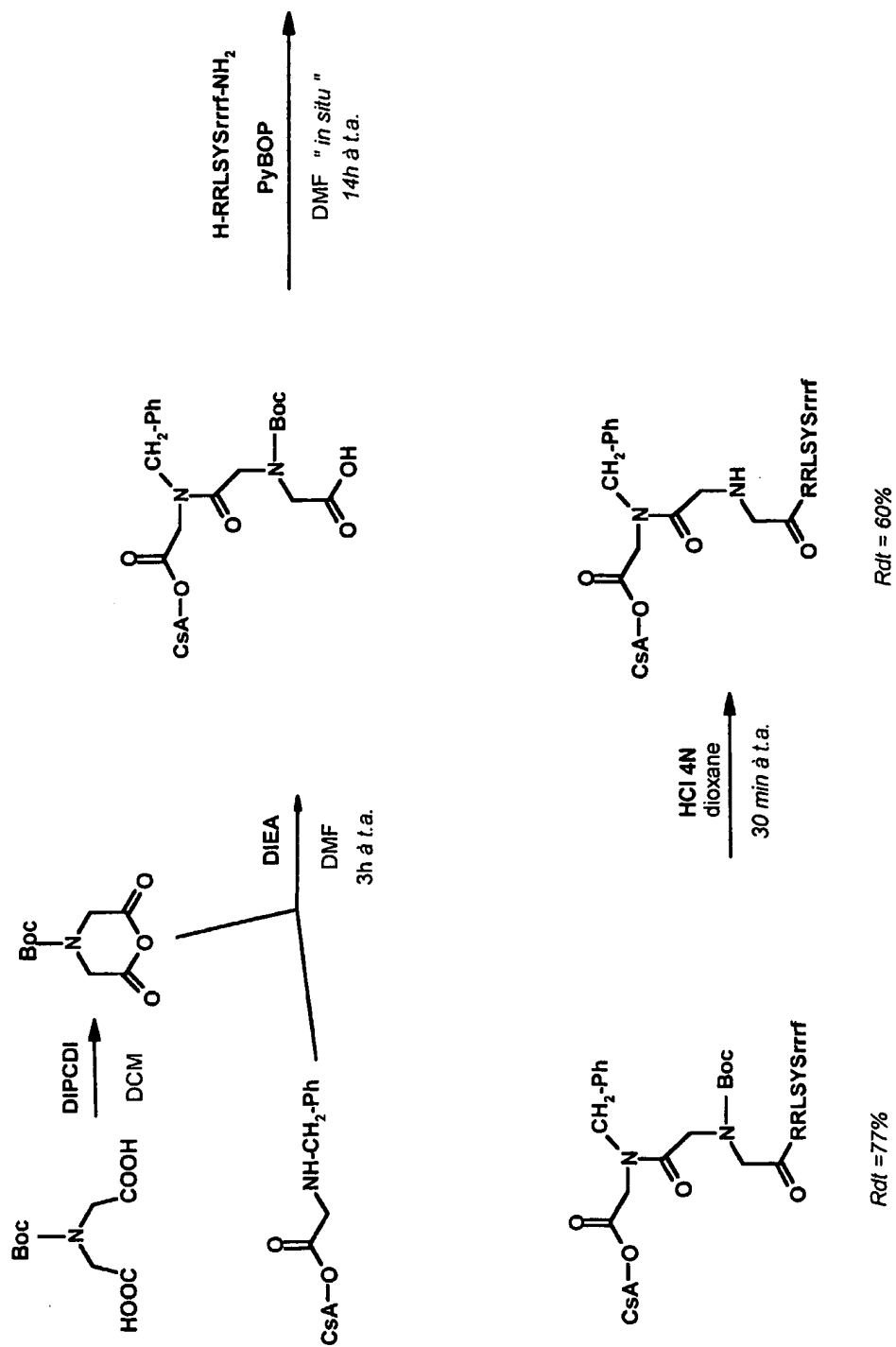
Hyp-O représente un résidu hydroxyproline où le groupe hydroxy est en position 2, ou 3, ou 4 de la proline, la liaison au reste du bras de liaison se faisant par l'intermédiaire de l'oxygène du groupe hydroxy de  
35 l'hydroxyproline,



les carbones asymétriques présents dans les groupes R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub> ou Hyp-O pouvant être de configuration R ou S.



Figure 2



3/14

Figure 3

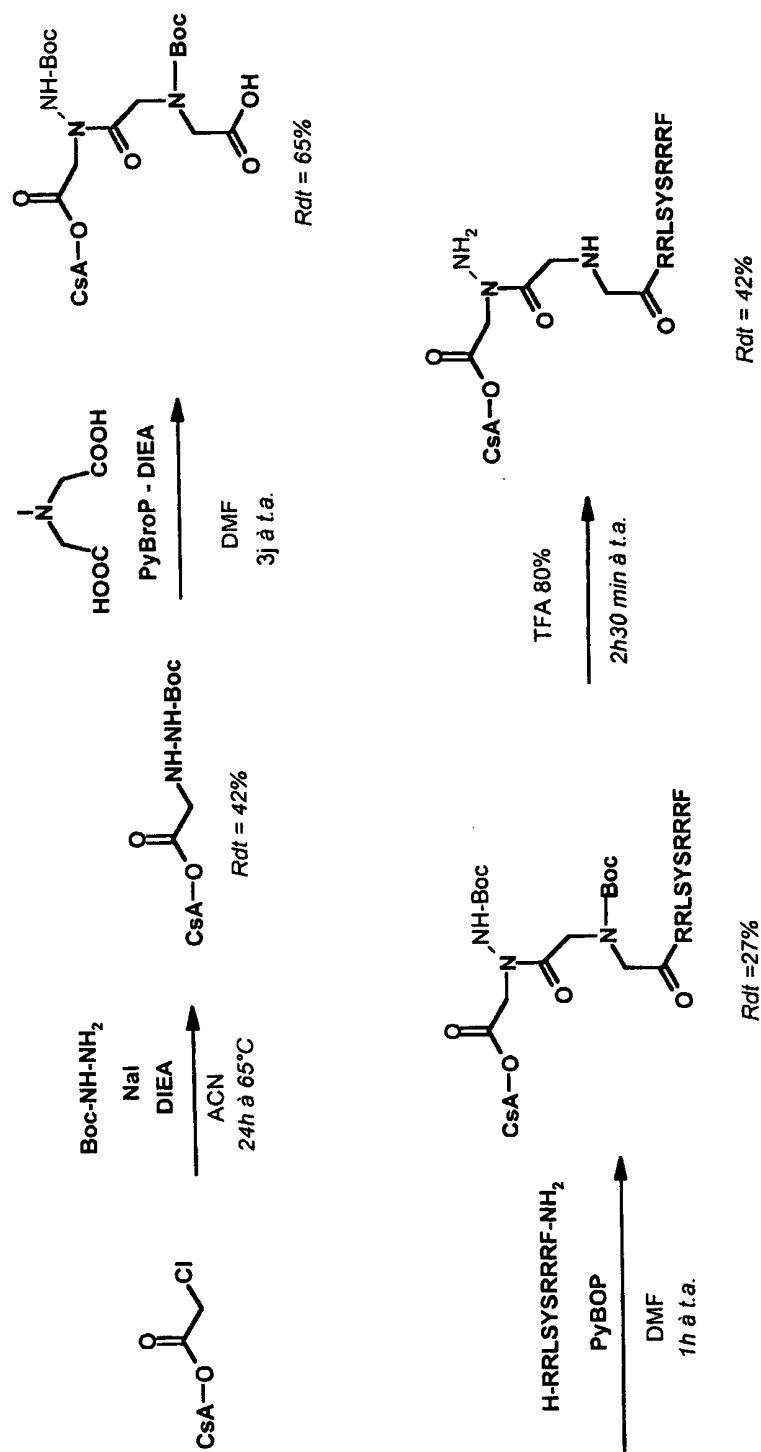
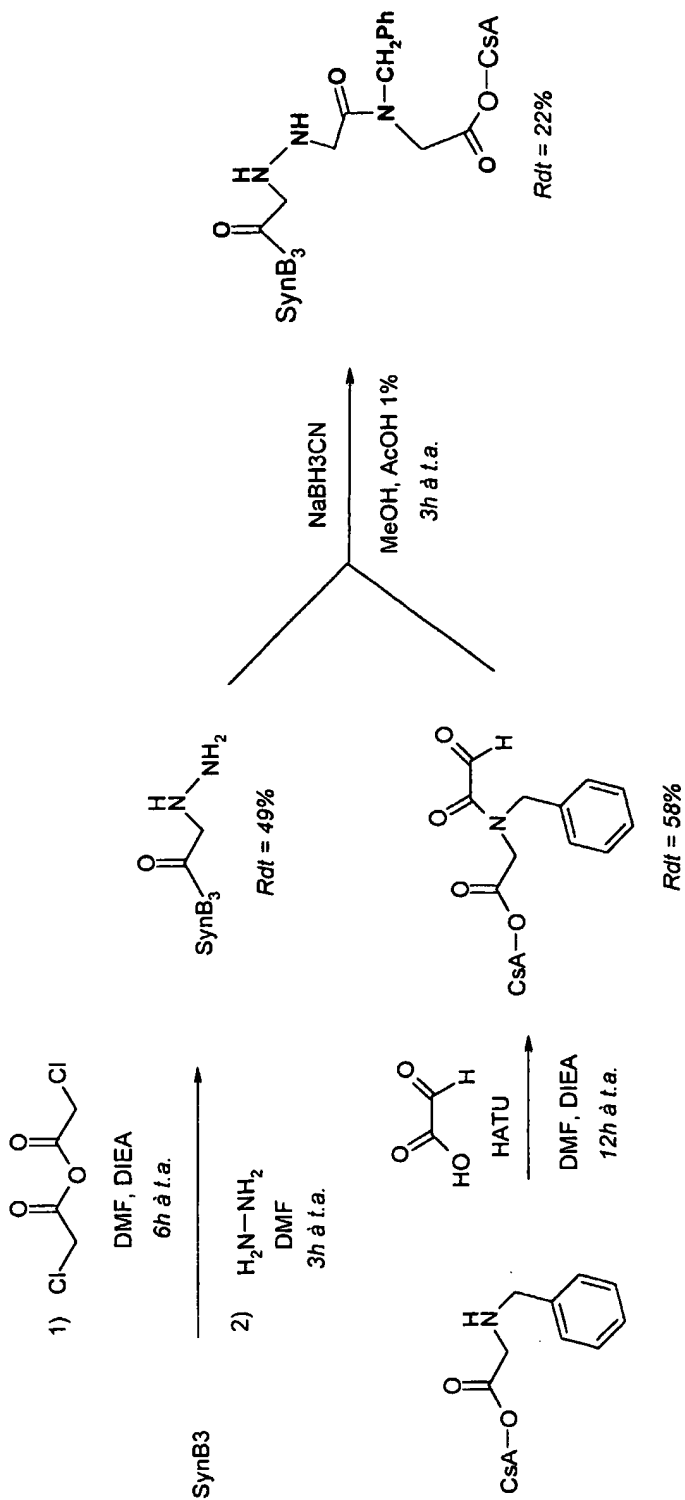


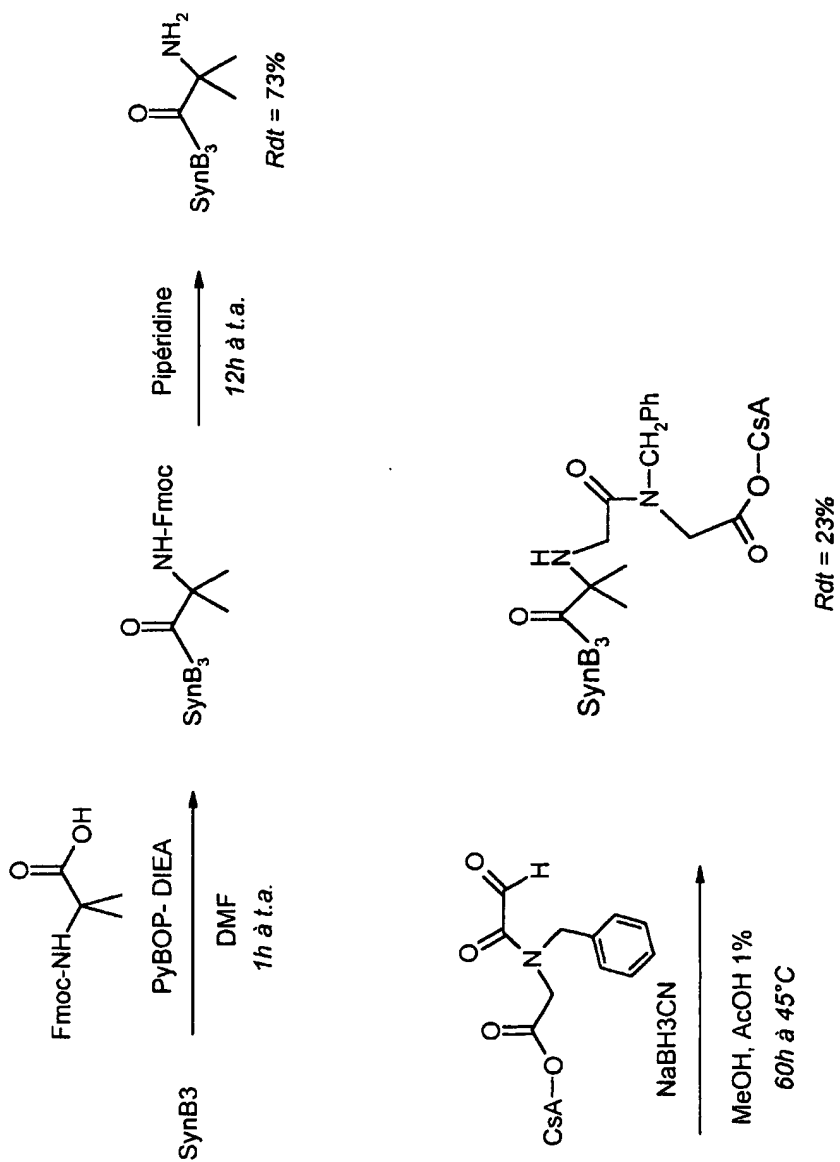
Figure 4





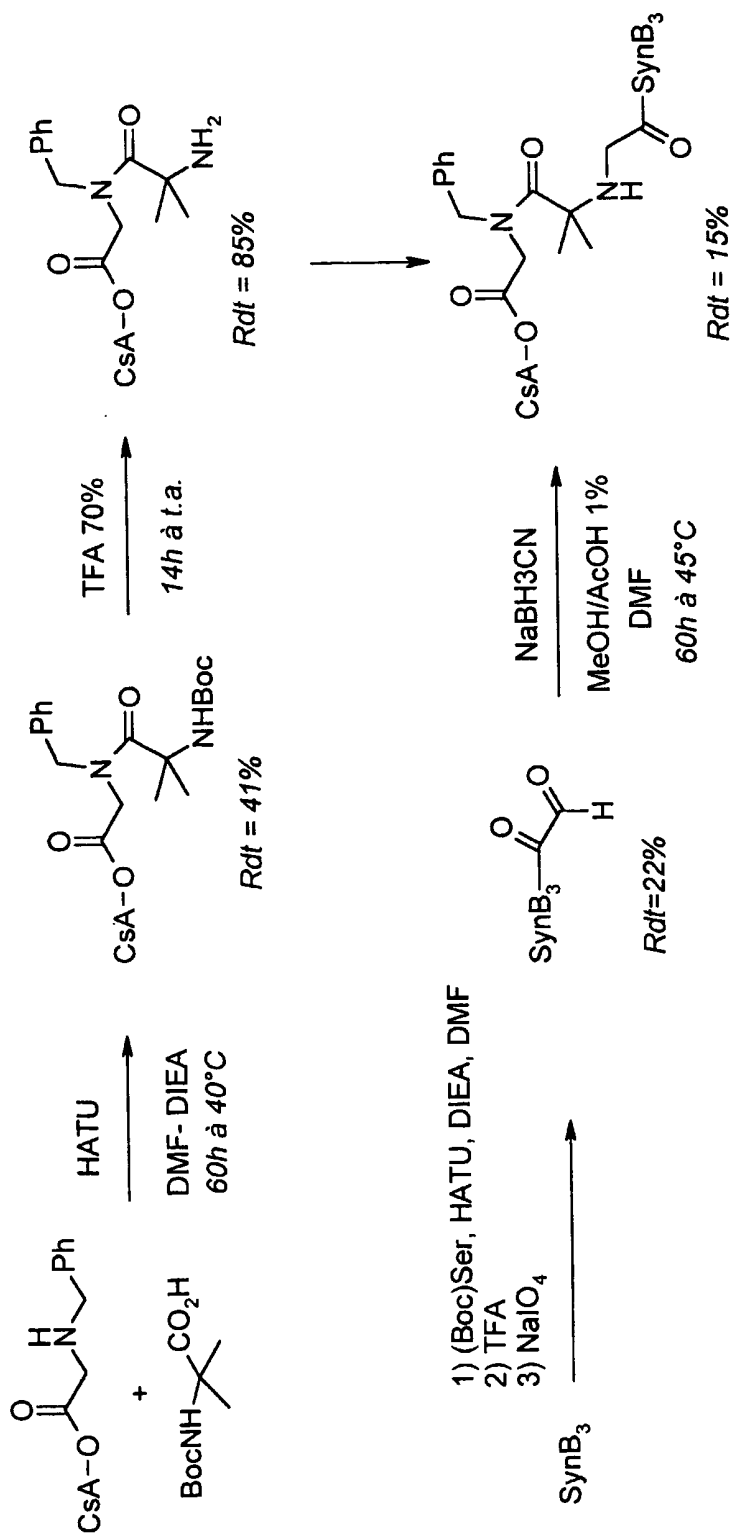
6/14

Figure 6



7/14

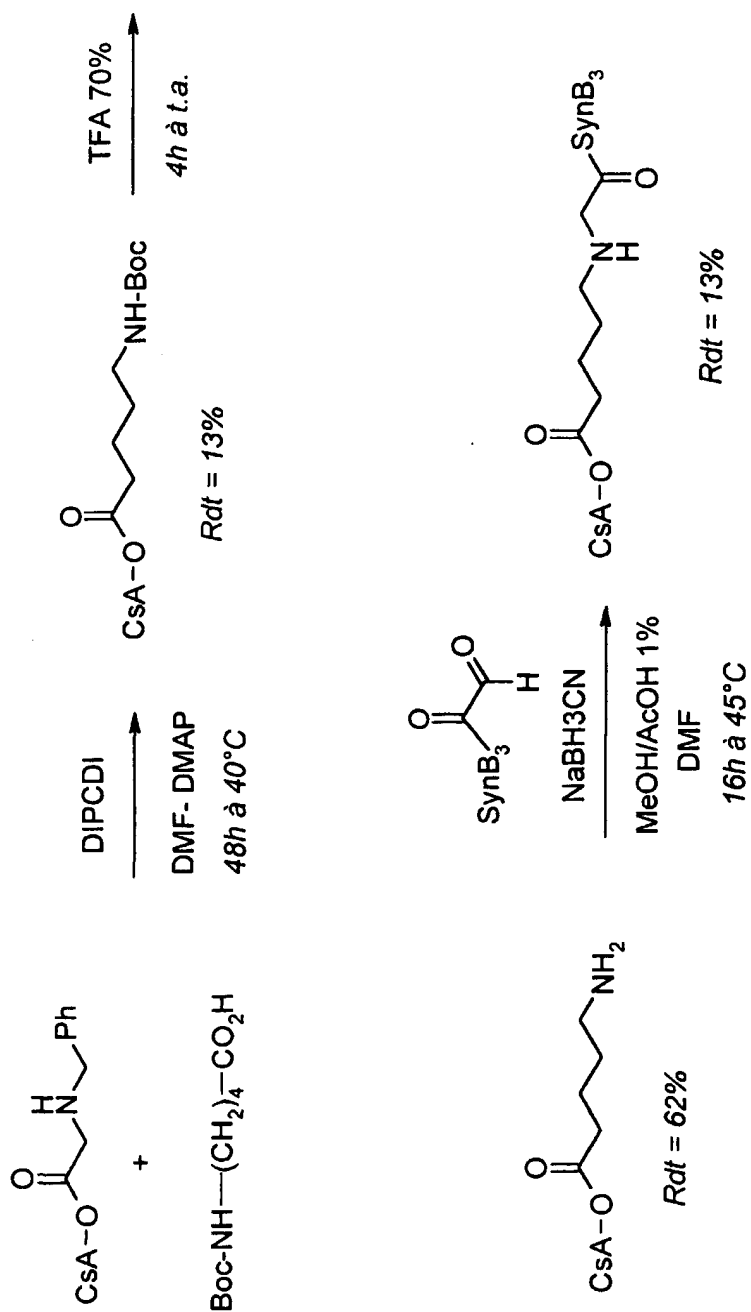
Figure 7





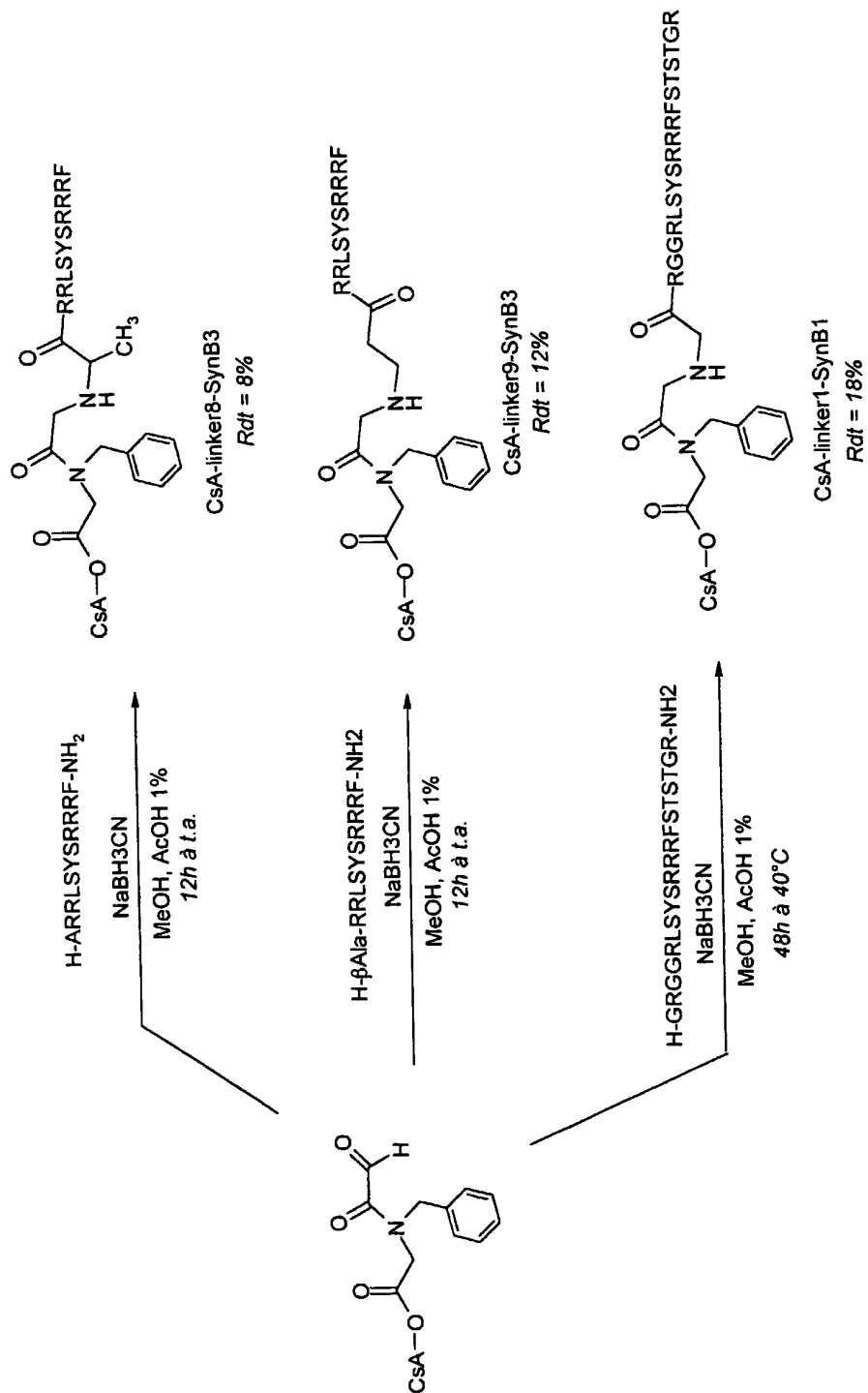
8/14

Figure 8



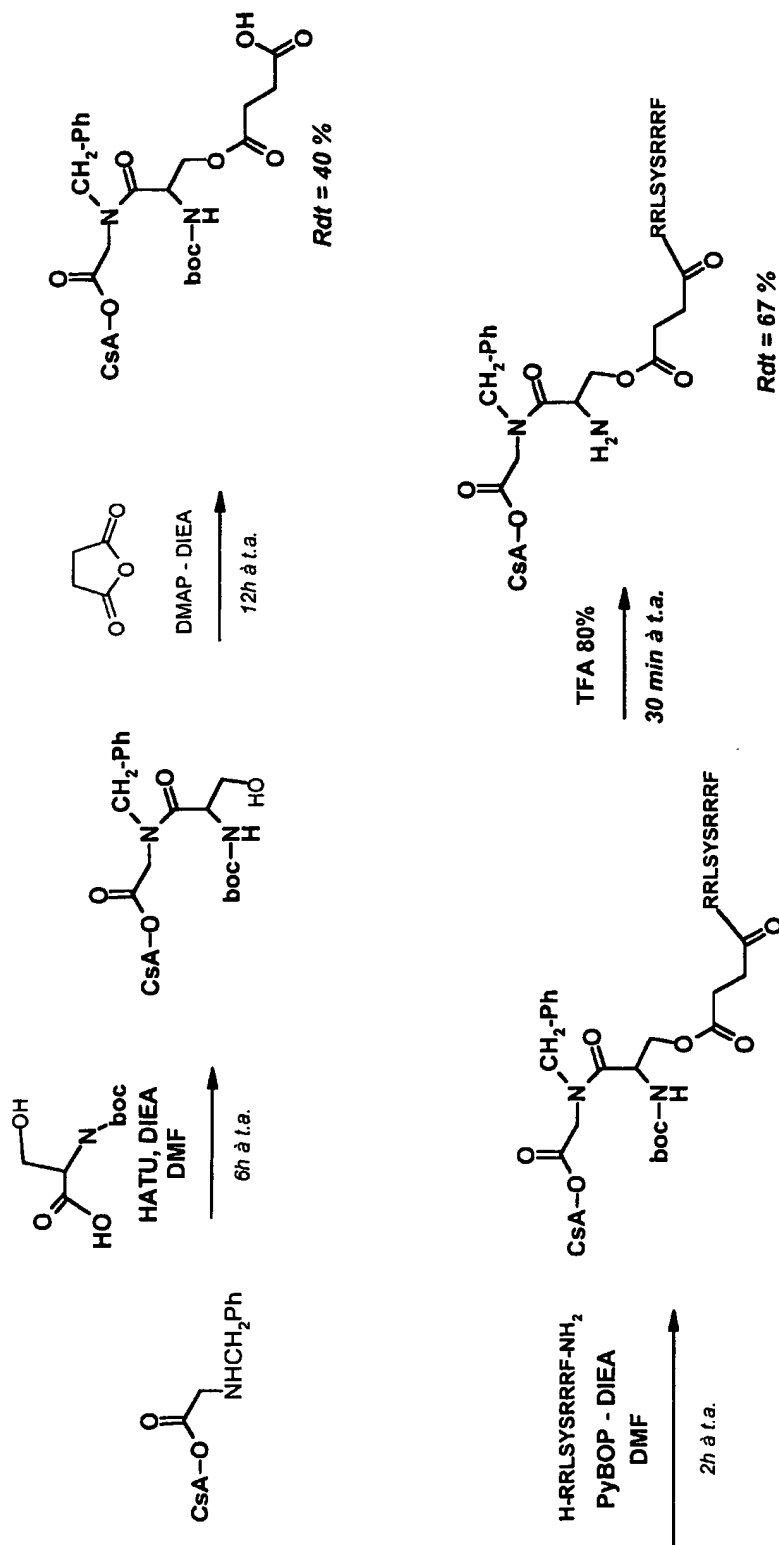
9/14

Figure 9



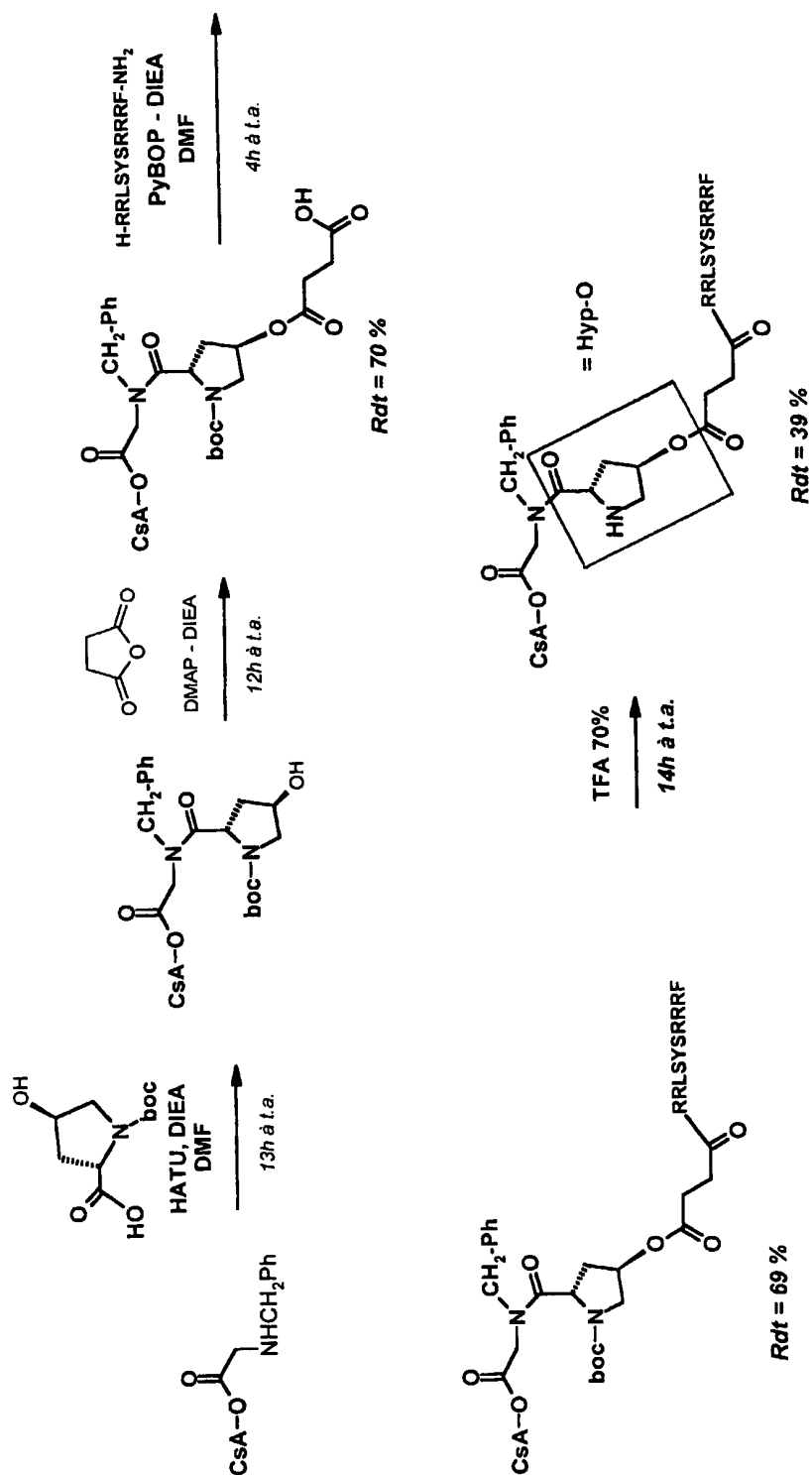
10/14

Figure 10



11/14

Figure 11



12/14

Figure 12

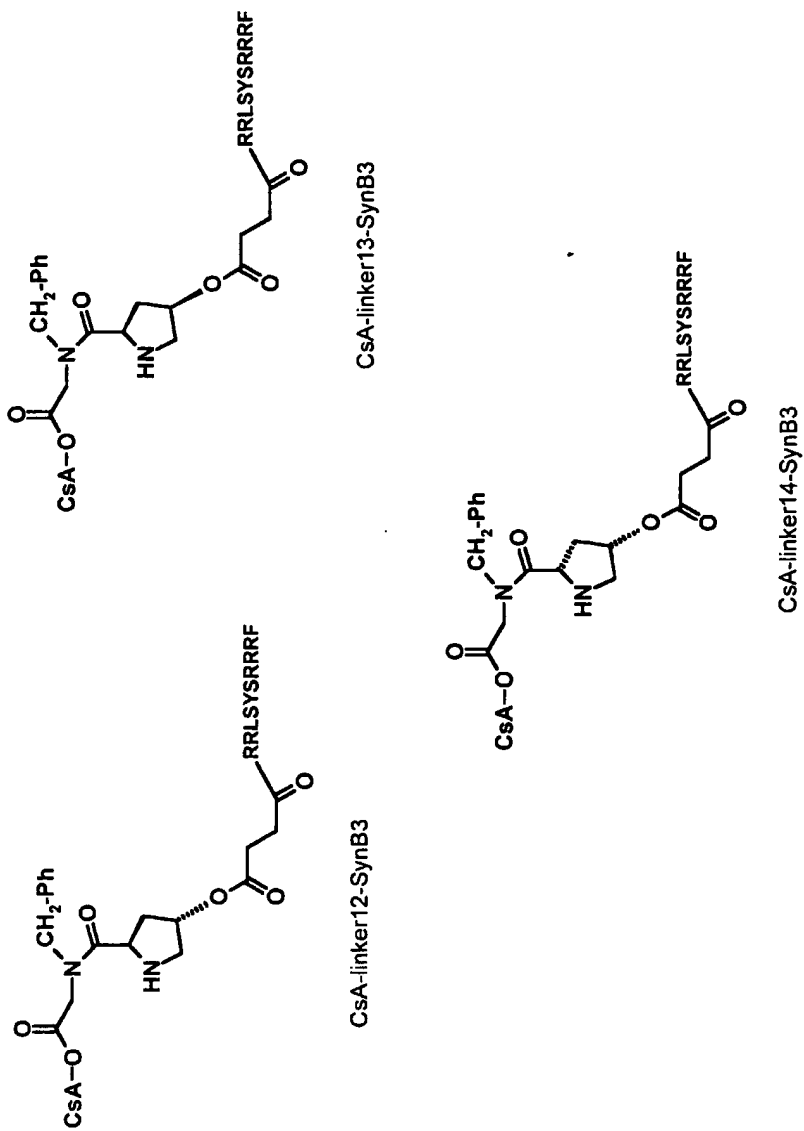


Figure 13

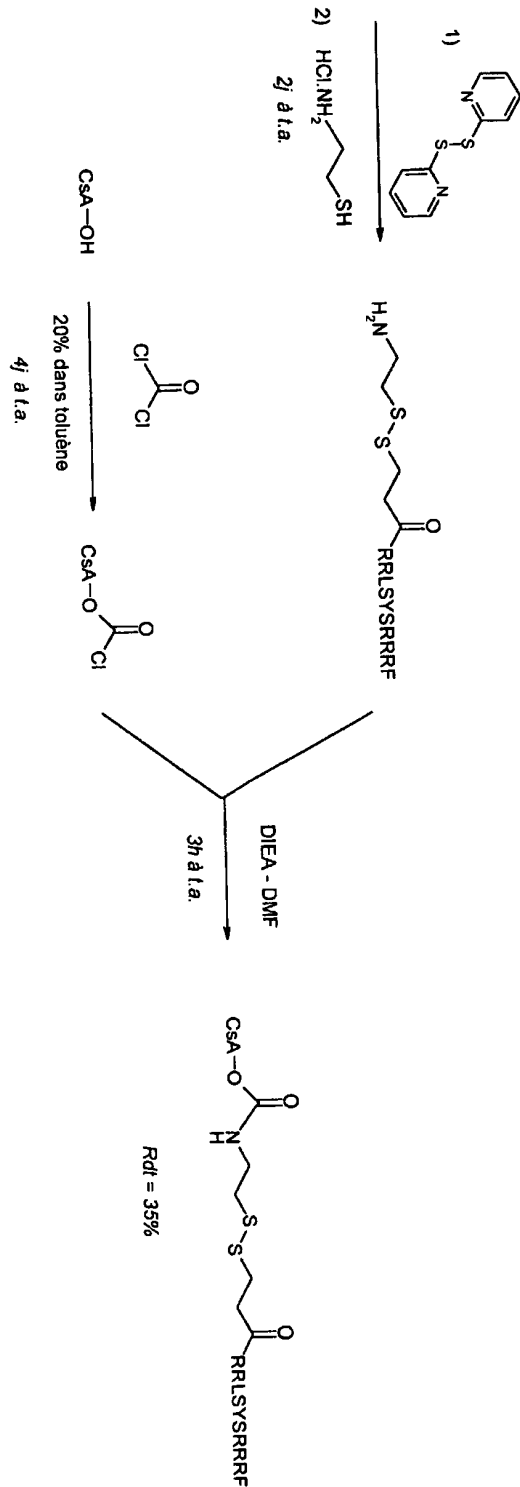
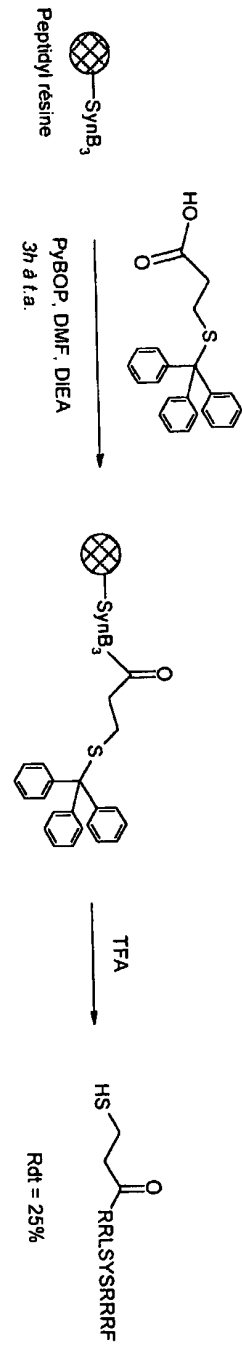
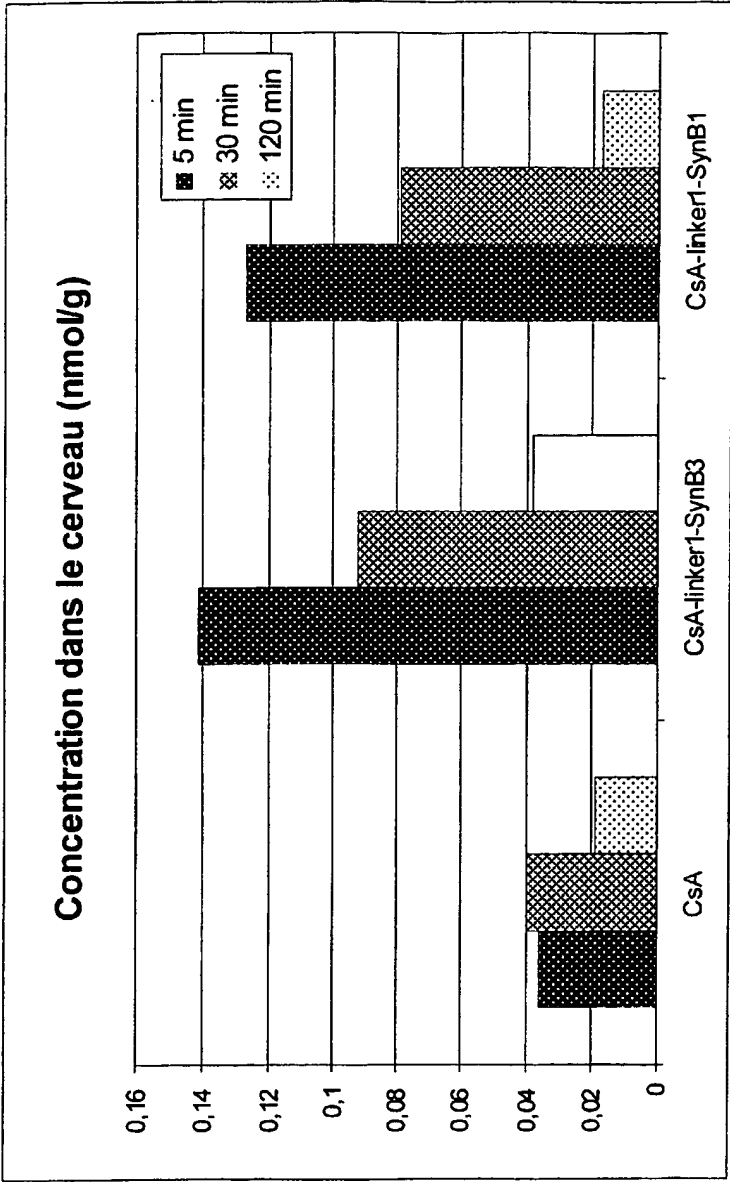


Figure 14



## LISTAGE DE SÉQUENCES

<110> SYNT:EM  
Maas BioLab, LLC

<120> Composés, compositions et méthode pour le transport des molécules de cyclosporine à travers la barrière hémato-encéphalique

<130> 24586/PCT

<140> PCT/FR03/XXXXX

<141> 2003-02-24

<150> FR 02/02299

<151> 2002-02-02

<160> 6

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> unidentified

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(10)

<223> Peptide SynB3

<400> 1

Arg Arg Leu Ser Tyr Ser Arg Arg Arg Phe  
1 5 10

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> unidentified

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(10)

<223> Peptide SynB3 L/D

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(6)

<223> Acides aminés L

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (7)..(10)

<223> Acides aminés D

<400> 2

Arg Arg Leu Ser Tyr Ser Arg Arg Arg Phe  
1 5 10

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> unidentified

<220>

<221> PEPTIDE



<222> (1)..(11)  
<223> Ala-SynB3  
<400> 3

Ala Arg Arg Leu Ser Tyr Ser Arg Arg Arg Phe  
1 5 10

<210> 4  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> unidentified  
<220>  
<221> PEPTIDE  
<222> (1)..(11)  
<223> Bêta-Ala-SynB3  
<400> 4

Ala Arg Arg Leu Ser Tyr Ser Arg Arg Arg Phe  
1 5 10

<210> 5  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> unidentified  
<220>  
<221> PEPTIDE  
<222> (1)..(19)  
<223> Gly-SynB1  
<400> 5

Gly Arg Gly Gly Arg Leu Ser Tyr Ser Arg Arg Arg Phe Ser Thr Ser  
1 5 10 15

Thr Gly Arg

<210> 6  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> unidentified  
<220>  
<221> PEPTIDE  
<222> (1)..(18)  
<223> SynB1  
<400> 6

Arg Gly Gly Arg Leu Ser Tyr Ser Arg Arg Arg Phe Ser Thr Ser Thr  
1 5 10 15

Gly Arg

This Page Blank (uspto)